

**Identifizierung Hämolyse-assoziiierter Faktoren des  
Lungenpathogens *Legionella pneumophila* und  
Charakterisierung der  
Patatin-ähnlichen Phospholipase A PatA**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Kathleen Seipel  
aus Freital

1. Referentin: Professor Dr. Antje Flieger  
2. Referent: Professor Dr. Michael Steinert  
eingereicht am: 18.07.2012  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.11.2012

Druckjahr 2012

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

**Seipel, K., Siegbrecht, E. & Flieger, A.:** Identification and characterization of *Legionella pneumophila* hemolysins. (Poster). 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen (2009).

**Seipel, K., Siegbrecht, E. & Flieger, A.:** Identification and characterization of *Legionella pneumophila* hemolysis-promoting genes. (Poster). 9. International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM), Wernigerode (2010).

**Aurass, P., Seipel, K. & Flieger, A.:** Patatin-like Proteins of *Legionella pneumophila* - novel factors in bacterium-host interplay. (Poster). 1st North-Regio-Day on Infection (NORDI), Braunschweig (2010).

**Seipel, K., Aurass, P. & Flieger, A.:** The Patatin-like Protein VipD/ PatA – a phospholipase A of *Legionella pneumophila* playing a role in bacterium-host interaction. (Poster). Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen (2012).

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Legionella pneumophila</i> – Der Erreger der Legionärskrankheit.....	1
1.2 Biologie von <i>Legionella pneumophila</i> .....	2
1.2.1 Mikrobiologie und Ökologie .....	2
1.2.2 Replikation von <i>Legionella pneumophila</i> in eukaryotischen Zellen.....	4
1.3 Diagnostik und Therapie einer Legionelleninfektion.....	7
1.4 Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i> .....	8
1.4.1 Proteinsekretionssysteme .....	9
1.4.1.1 Das <i>Legionella</i> Lsp Sekretionssystem.....	10
1.4.1.2 Das <i>Legionella</i> Dot/Icm Sekretionssystem .....	11
1.5 Hämolyse-assoziierte Faktoren bei <i>L. pneumophila</i> .....	13
1.6 Pathogenitätsfaktor: Phospholipasen A bei <i>L. pneumophila</i> .....	15
1.6.1 Patatin und Patatin-ähnliche Phospholipasen.....	17
1.6.1.1 Patatin-ähnliche Phospholipasen von <i>L. pneumophila</i> .....	19
1.6.1.2 Die PLP ExoU von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Pathogenitätsfaktor .....	21
1.6.1.3 Die PLP VipD/PatA von <i>Legionella pneumophila</i> .....	22
1.7 Ziel der Arbeit .....	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Laborausstattung .....	25
2.1.2 Spezielle Materialien.....	26
2.1.3 Chemikalien .....	27
2.1.4 Lipidsubstrate .....	29
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	29
2.1.6 Enzyme, Standards und Antikörper .....	30
2.1.7 Analyse-Kits.....	31
2.1.8 Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen .....	32
2.1.8.1 Verwendete Plasmide .....	32
2.1.8.2 Verwendete Oligonukleotide.....	33
2.1.8.3 Verwendete Bakterien und Zellen.....	35
2.1.9 Erzeugte und verwendete gentechnisch veränderte Organismen (GVO).....	36
2.1.10 Kulturmedien für Bakterien und Zellen .....	39
2.1.11 Verwendete Software .....	41
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 Kultivierung von Bakterien .....	42
2.2.1.1 <i>Legionella pneumophila</i> .....	42
2.2.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.2.1.3 Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen .....	43

2.2.2 Anzucht von Makrophagen, Epithel- und <i>Acanthamoeba</i> -Zellkulturen .....	43
2.2.3 Grundlegende Nukleinsäure-Techniken.....	43
2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA von <i>Legionella</i> .....	43
2.2.3.2 Isolierung extrachromosomaler DNA .....	44
2.2.3.3 Isolierung von RNA .....	44
2.2.3.4 Nukleinsäureverdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung .....	44
2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten .....	45
2.2.3.6 Fällung von Nukleinsäuren .....	45
2.2.3.7 Nukleinsäure-Gelelektrophorese .....	45
2.2.3.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	46
2.2.3.9 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion .....	47
2.2.3.10 Inverse Polymerase Kettenreaktion.....	48
2.2.3.11 Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion.....	48
2.2.3.12 Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA .....	49
2.2.4 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen .....	50
2.2.4.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	50
2.2.4.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>L. pneumophila</i> .....	50
2.2.5 Transfektion von A549 Lungenepithelzellen .....	51
2.2.6 Transfektion von U937 Makrophagen .....	52
2.2.7 Depletion von Cholesterol in A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen.....	53
2.2.8 Infektion von <i>Acanthamoeba castellanii</i> und U937 Makrophagen .....	53
2.2.8.1 Infektion von <i>A. castellanii</i> .....	53
2.2.8.2 Infektion von U937 Makrophagen .....	54
2.2.9 Fixierung von Zellen und Bakterien.....	54
2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung von Präparaten .....	55
2.2.10.1 Immunfluoreszenzfärbung von <i>Legionella</i> -Kulturen .....	55
2.2.10.2 Immunfluoreszenzfärbung von U937-Infektionen .....	55
2.2.11 Nachweis von Phospholipaseaktivität .....	56
2.2.11.1 Gewinnung von bakteriellen Zellpelletlysaten und Kulturüberständen .....	56
2.2.11.2 Verdau von Lipidsubstraten .....	56
2.2.11.3 Messung der freien Fettsäuren .....	57
2.2.11.4 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie.....	57
2.2.11.5 Hämolyseassay .....	58
2.2.12 Expression und Reinigung von Proteinen .....	58
2.2.12.1 Proteinexpression und Zellaufschluss .....	58
2.2.12.2 Reinigung von His <sub>6</sub> -markierten Proteinen .....	59
2.2.13 Proteinanalytik .....	59
2.2.13.1 Fällung von Proteinen mittels TCA-EtOH.....	59
2.2.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	60
2.2.13.3 Eindimensionale (1D) – SDS-PAGE .....	60
2.2.13.4 Western Blot und Immundetektion .....	60
2.2.14 Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen mittels Pull Down-Assay .....	61
2.2.15 Identifikation von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie .....	62
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>63</b>
3.1 Suche und Identifizierung neuer Hämolyse-assoziiierter <i>Legionella</i> Gene .....	63
3.1.1 Screening einer <i>Legionella</i> -Tn5 Insertionsmutanten-Klonbank auf Mutanten mit verändertem hämolytischen, lipolytischen und proteolytischen Potential .....	63
3.1.2 Identifikation der Tn5-Insertionsorte im Chromosom ausgewählter Mutanten .....	65
3.1.2.1 Zusammenstellung der identifizierten Gene ausgewählter Tn5-Mutanten .....	66

3.1.3 Weiterführende Charakterisierung der hämolytischen Aktivität ausgewählter Mutanten.....	72
3.1.4 Charakterisierung einer Hämolyse-verminderten Mutante mit Insertionsort im Genlokus lpc0979 ( <i>pabB</i> ::Tn5 Mutante) .....	75
3.1.4.1 Komplementation der <i>pabB</i> ::Tn5 Mutante und Bestimmung der hämolytischen Aktivität .....	77
3.1.4.2 Untersuchung der intrazellulären Vermehrung der <i>pabB</i> ::Tn5 Mutante in <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	78
3.2 Charakterisierung von PatA – ein hämolytisch wirkendes, Patatin-ähnliches Protein von <i>L. pneumophila</i> .....	79
3.2.1 <i>In silico</i> Analyse von <i>L. pneumophila</i> PatA.....	80
3.2.2 Untersuchung der hämolytischen Aktivität von rekombinant exprimiertem PatA .....	82
3.2.3 Untersuchung der lipolytischen Aktivität von gereinigtem PatA .....	83
3.2.4 Lokalisation von PatA in Wirtszellen .....	86
3.2.4.1 Lokalisation von PatA in transfizierten A549 Lungenepithelzellen – Rolle des C-Terminus .....	87
3.2.4.2 Lokalisation von PatA in transfizierten A549 Lungenepithelzellen – Quantifizierung der Lokalisation mutierter GFP-PatA-Proteinvarianten .....	92
3.2.4.3 Spezifizierung der Lokalisation von PatA in transfizierten Wirtszellen – Depletion von Cholesterol.....	96
3.2.4.4 Lokalisation von PatA in <i>L. pneumophila</i> und infizierten U937 Makrophagen.....	98
3.2.5 Suche nach eukaryotischen Interaktionspartnern von PatA .....	104
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>107</b>
4.1 Identifikation neuer Hämolyse-assoziiierter <i>Legionella</i> Gene .....	107
4.1.1 Bewertung des Agarplatten-basierten <i>Screening</i> -Verfahrens für die Identifikation neuer zytolytischer Faktoren von <i>Legionella pneumophila</i> .....	107
4.1.2 Beispiele neuer putativ Virulenz-assoziiierter Gene .....	108
4.1.3 Charakterisierung von <i>L. pneumophila</i> -Mutanten mit Insertionen in Aminosäure-Metabolismus-assoziierten Genen und verändertem hämolytischen Phänotyp .....	112
4.1.4 Bedeutung des Aminosäurestoffwechsels von <i>L. pneumophila</i> - Überlegungen zum Thema Metabolismus und Virulenz .....	116
4.2 PatA – ein Patatin-ähnliches Protein von <i>L. pneumophila</i> .....	118
4.2.1 Charakterisierung der hämolytischen und lipolytischen Eigenschaften von PatA .....	118
4.2.2 Identifikation wichtiger Proteindomänen für die intrazelluläre Lokalisation von PatA .....	120
4.2.3 Lokalisation von PatA während einer Wirtszellinfektion .....	129
4.2.4 Versuche zur Identifikation putativer Interaktionspartner von PatA .....	131
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>133</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>153</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1: Der intrazelluläre Replikationszyklus von <i>L. pneumophila</i> .....	5
1.2: Spaltung von Phosphatidylcholin (PC) durch Phospho-/ Lysophospholipasen A.....	15
1.3: Wirkungen bakterieller Phospholipasen als Virulenzfaktoren .....	16
1.4: Übersicht der Proteine mit Patatin-Domäne in <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1 .....	20
3.1: <i>Screening</i> vereinzelter Klone der <i>L. pneumophila</i> Corby Tn5-Klonbank auf <i>Legionella</i> Humanblut-, Eigelb- und Casein-Agar .....	64
3.2: Inverse PCR zur Identifikation der Tn5-Insertionsorte im Chromosom ausgewählter <i>Legionella</i> - Mutanten .....	65
3.3: Schematische Darstellung der Verknüpfung des Shikimat- und Folat-Biosyntheseweges mit Chorismat als zentralem Präkursor .....	72
3.4: Wachstumskurve, Vergleich der Legiolysinbildung und Flüssighämolysetest der <i>Legionella</i> -Mutante JR32 XXIII A5 ( <i>aroC</i> ::Tn5) im Vergleich zum Wildtyp .....	73
3.5: Flüssighämolysetest mit <i>L. pneumophila</i> Corby und den Mutanten Corby I F6 ( <i>pabB</i> ::Tn5), Transposoninsertion im <i>pabB</i> -Gen ( <i>lpc0979</i> ), II B2 ( <i>proA</i> ::Tn5), Transposoninsertion im <i>proA</i> -Gen ( <i>lpc2877</i> ), und XVIII F12 ( <i>yrfl</i> ::Tn5), Transposoninsertion im <i>yrfl</i> -Gen ( <i>lpc3104</i> ).....	74
3.6: Genomischer Hintergrund des Gens <i>lpc0979</i> in <i>L. pneumophila</i> Corby und Darstellung der Transposon-Insertionsstelle in der Mutante <i>pabB</i> ::Tn5 .....	76
3.7: Reverse Transkriptase-PCR zur Überprüfung der Genexpression von <i>lpc0978</i> und <i>lpc0979</i> in der Mutante <i>L. pneumophila</i> Corby <i>pabB</i> ::Tn5 und dem Wildtyp .....	76
3.8: Reverse Transkriptase-PCR zur Überprüfung der Genexpression von <i>lpc0979</i> in der Komplementante <i>L. pneumophila</i> Corby <i>pabB</i> ::Tn5 (pKS4) .....	77
3.9: Flüssighämolysetest mit <i>L. pneumophila</i> Corby, der Mutante Corby <i>pabB</i> ::Tn5 und der Komplementante Corby <i>pabB</i> ::Tn5 (pKS4) .....	78
3.10: Koinfektion der <i>Legionella</i> -Stämme Corby, der Mutante Corby <i>pabB</i> ::Tn5 und der Komplementante Corby <i>pabB</i> ::Tn5 (pKS4) mit <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	79
3.11: Vorkommen Patatin-ähnlicher Proteine (PLP) in verschiedenen taxonomischen Reichen.....	80
3.12: Schematische Darstellung des PatA-Proteins.....	81
3.13: Sequenzvergleich der Aminosäuren von <i>L. pneumophila</i> PatA und <i>P. aeruginosa</i> ExoU.....	82
3.14: Hämolytische Aktivität von PatA und PatA-Mutanten .....	83
3.15: Chromatographische Reinigung von rekombinant exprimiertem <i>L. pneumophila</i> His <sub>6</sub> -PatA, His <sub>6</sub> - PatAS73A und His <sub>6</sub> -PatAK492Stop .....	84
3.16: Lipidhydrolyseaktivität von His <sub>6</sub> -PatA und der katalytischen His <sub>6</sub> -PatAS73A-Mutante.....	85
3.17: Lipidhydrolyseaktivität von His <sub>6</sub> -PatA und His <sub>6</sub> -PatAS73A-, His <sub>6</sub> -PatAK492Stop-Mutanten.....	86
3.18: Lokalisation von GFP-PatA und mutierter GFP-PatA-Versionen in transfizierten A549 Lungenepithelzellen .....	88
3.19: Schematische Darstellung wichtiger funktionaler Bereiche und Domänen im PatA-Protein .....	90

3.20: Lokalisation von GFP-PatA und mutierter GFP-PatA-Versionen in transfizierten A549 Lungenepithelzellen .....	91
3.21: Darstellung der generierten GFP-PatA-Konstrukte und deren Lokalisation nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen .....	93
3.22: Western Blot mit GFP-spezifischem Antikörper zur Kontrolle der Expression verschiedener GFP-PatA- Proteinvarianten nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen.....	94
3.23: Western Blot mit PatA-spezifischem Antikörper zur Kontrolle der Expression verschiedener GFP-PatA- Proteinvarianten nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen.....	95
3.24: Dünnschichtchromatographie der für Transfektionsexperimente verwendeten U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen und Western Blot der A549 Transfektion mit GFP-PatA.....	97
3.25: Western Blot zur Kontrolle der Expression von pPA123 in <i>L. pneumophila</i> JR32 Stämmen .....	99
3.26: U937 Makrophagen-Infektion mit <i>L. pneumophila</i> JR32 und <i>L. pneumophila</i> JR32 (pPA99).....	100
3.27: U937 Makrophagen-Infektion mit <i>L. pneumophila</i> JR32, <i>L. pneumophila</i> JR32 (pPA123) und <i>L.</i> <i>pneumophila</i> JR32 $\Delta dotB$ (pPA123).....	102
3.28: Western Blot zur Kontrolle der Expression von Flag-PatA durch verschiedene <i>L. pneumophila</i> JR32- Mutanten während einer U937 Makrophagen-Infektion .....	103
3.29: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel zu einem Pull-Down Assay mit His <sub>6</sub> -PatAS73A und U937 Makrophagenzelllysat.....	105
3.30: Silber-gefärbtes SDS-PAGE Gel zu Pull-Down Assays mit His-PatAS73A und A549 Lungenepithelzelllysat (links) bzw. U937 Makrophagenzelllysat (rechts).....	105



## Tabellenverzeichnis

2.1: Auflistung der verwendeten Geräte .....	25
2.2: Auflistung spezieller Materialien .....	26
2.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien .....	27
2.4: Auflistung der verwendeten Lipidsubstrate .....	29
2.5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen .....	29
2.6: Auflistung verwendeter Enzyme, Standards und Antikörper .....	30
2.7: Auflistung der verwendeten Analyse-Kits .....	31
2.8: Auflistung verwendeter Plasmide .....	32
2.9: Auflistung verwendeter, in Vorarbeiten generierter Plasmide .....	32
2.10: Auflistung erzeugter Plasmide .....	32
2.11: Auflistung verwendeter Oligonukleotide .....	33
2.12: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinien .....	35
2.13: Auflistung erzeugter und verwendeter gentechnisch veränderter Organismen (GVO) .....	36
2.14: Auflistung der aus der Transposon (Tn5)-Klonbank isolierten Mutanten .....	38
2.15: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von <i>L. pneumophila</i> .....	39
2.16: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	40
2.17: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von <i>A. castellanii</i> und zur Infektion der Amöben mit <i>L. pneumophila</i> .....	40
2.18: Auflistung des Nährmediums zur Kultivierung und Infektion von U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen .....	41
2.19: Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium .....	41
2.20: Verwendete Software und Internet-Datenbanken .....	41
2.21: Reaktionsansatz für eine Standard- und eine Kolonie-PCR .....	46
2.22: Programm für eine Standard- und Kolonie-PCR .....	46
2.23: Reaktionsansatz für eine RT-PCR .....	47
2.24: Programm für eine „OneStep“-RT-PCR .....	47
2.25: Reaktionsansatz für eine inverse PCR .....	48
2.26: Programm für eine inverse PCR .....	48
2.27: Reaktionsansatz für eine Sequenzier-PCR .....	49
2.28: Programm für eine Sequenzier-PCR .....	49
2.29: Reaktionsansatz für eine Mutagenese-PCR .....	49
2.30: Programm für eine Mutagenese-PCR .....	49
3.1: Übersicht <i>gescreenter</i> Mutanten der <i>L. pneumophila</i> Stämme JR32 und Corby mit verändertem lytischen Verhalten im Vergleich zum Wildtyp .....	63
3.2: Übersicht der mittels inverser PCR und Sequenzierung identifizierten Transposon-Insertionsorte ausgewählter Mutanten von <i>L. pneumophila</i> Corby und Zusammenfassung der im Agarplattentest ermittelten lytischen Aktivität .....	67

---

3.3: Übersicht der mittels inverser PCR und Sequenzierung ermittelten Transposon-Insertionsorte ausgewählter Mutanten von <i>L. pneumophila</i> JR32 und Zusammenfassung der im Agarplattentest ermittelten lytischen Aktivität .....	68
---	----

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
AS	Aminosäure
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BYE	<i>Buffered Yeast Extract</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
CFU	<i>colony forming units</i> (Koloniebildende Einheiten)
CL	Cardiolipin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
FFA	<i>free fatty acids</i> , freie Fettsäuren
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GCAT	Glycerophospholipid-Cholesterol Azytransferase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	kilo-Dalton
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	Luria-Bertani
LCV	<i>Legionella containing vacuole</i>
LPLA	Lysophospholipase A
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
M	Molar
Min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
1-MPG	1-Monopalmitoylglycerol
MPLPC	1-Monopalmitoyllysophosphatidylcholin

<b>MPLPG</b>	1-Monopalmitoyllysophosphatidylglyzerol
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>Mw</b>	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
<b>OD</b> Wellenlänge (in nm)	optische Dichte
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
<b>PAGE</b>	<i>polyacrylamid gel electrophoresis</i>
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PC</b>	Phosphatidylcholin
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PLA</b>	Phospholipase A
<b>PLB</b>	Phospholipase B
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>PLP</b>	<i>patatin-like protein</i> (Patatin-ähnliches Protein)
<b>PMA</b>	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
<b>PVDF</b>	Polyvinyliden Fluorid
<b>PYG</b>	<i>Peptone Yeast Extract Glucose</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	reverse Transkriptase-PCR
<b>SDS</b>	Sodium Dodezyl Sulfat
<b>SOC</b>	Derivat von <i>Super Optimal Broth</i>
<b>s.</b>	siehe
<b>sek</b>	Sekunde
<b>TAE</b>	Tris-Azetat-EDTA
<b>TLC</b>	<i>thin layer chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
<b>U</b>	Units (Enzymaktivität)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>× g</b>	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## Zusammenfassung

*Legionella pneumophila*, der Erreger einer schwer verlaufenden Pneumonie, der Legionärskrankheit, besitzt neben bekannten Virulenzfaktoren wie z. B. einem Typ IVB-Sekretionssystem sowie dessen sekretierten Effektoren, eine Vielzahl potentiell zytolytisch wirkender Proteine (Proteasen, Lipasen und Hämolsine), die zur Pathogenität des Bakteriums und damit zur intrazellulären Vermehrung in Amöben und humanen Alveolarmakrophagen beitragen können. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer Zytolysine von *L. pneumophila*. Dafür sollten zum einen durch ein *L. pneumophila* Mutanten-Screening hämolytisch, proteolytisch und lipolytisch wirkende Faktoren identifiziert werden, zum anderen sollte die bereits bekannte Phospholipase A PatA näher charakterisiert werden. Zur Detektion zytolytischer Faktoren wurde in dieser Arbeit ein Agarplatten-basiertes Screening-System angewandt, durch das 26 Gene identifiziert werden konnten, welche einen Einfluss vor allem auf das hämolytische Potential von *L. pneumophila* besaßen. Neben dem Gen für das *L. pneumophila* Hitzeschockprotein 33 (Hsp33) wurden zwei Gene, *aroC* und *pabB*, die für Enzyme des Shikimatweges bzw. der Folatbiosynthese codieren, als Hämolyse-assoziierte Faktoren identifiziert. Die *aroC*-Mutante war weiterhin in ihrer Fähigkeit zur Pigmentbildung stark vermindert, während die *pabB*-Mutante einen intrazellulären Vermehrungsdefekt im Infektionsmodell mit *Acanthamoeba castellanii* aufwies. Diese Metabolismus-assoziierten Gene bewirkten zwar einen veränderten hämolytischen Phänotyp, sind jedoch in dieser Hinsicht wahrscheinlich keine direkt aktiven Faktoren. Das Auffinden einer *proA*-Mutante, die auf den Agarplatten keine lytische Aktivität zeigte, bestätigte die Wirksamkeit des Screens.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte PatA, eine Patatin-ähnliche Phospholipase A von *L. pneumophila*, die über das Dot/Icm Typ IVB-Sekretionssystem in die Wirtszelle injiziert wird und ebenfalls hämolytische Eigenschaften besitzt, besonders in Bezug auf seine Aktivität und Lokalisation in der Wirtszelle charakterisiert werden. Durch *in vitro*-Experimente konnte für rekombinant exprimiertes PatA-Protein sowohl Phospholipase A- als auch Lysophospholipase A-Aktivität gegenüber verschiedenen Phospholipidsubstraten inklusive Cardiolipin nachgewiesen werden. Für diese lipolytischen Aktivitäten war das in ein G-X-S-X-G-Lipasmotiv eingebettete Serin 72 als Bestandteil einer katalytischen Diade mit Aspartat 288 essentiell. Nach Expression in humanen A549 Lungenepithelzellen lokalisierte PatA in punktförmigen Strukturen an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, wofür der C-terminale

Proteinbereich verantwortlich war. Die unabhängige Deletion zweier C-terminaler Proteinregionen, einer *low complexity*-Region zwischen den Aminosäuren E519 bis E527 und einer putativen Transmembran-Domäne im Bereich der Aminosäuren K533 bis D555, führte zum vollständigen Verlust der Zytoplasmamembranlokalisation. Weiterführende Studien zur Funktion von PatA an der Wirtszellmembran sind wünschenswert, da vor allem die Typ IVB-sekretierten Effektoren für eine Manipulation der Wirtszelle und eine effektive intrazelluläre Replikation von besonderer Wichtigkeit sind.

## 1 Einleitung

### 1.1 *Legionella pneumophila* – Der Erreger der Legionärskrankheit

Als 1976 auf einem Treffen der US-Kriegsveteranenvereinigung in Philadelphia plötzlich 182 Fälle einer lebensbedrohlichen Lungenentzündung unbekannter Ursache auftraten, war der Grundstein für die Entdeckung und Erforschung eines neuen Erregers gelegt (1). Da dieser Ausbruch insgesamt 29 Todesfälle forderte, begannen amerikanische Gesundheitsbehörden mit einer intensiven Suche nach dem Erreger. Als verursachendes Agens wurde 1977 schließlich ein gram-negatives, flagelliertes Stäbchenbakterium identifiziert, welches *Legionella pneumophila* genannt wurde (2). Diese Bakterien sind in der Lage, sich innerhalb infizierter Wirtszellen zu vermehren. Neben eines mild verlaufenden selbstlimitierenden respiratorischen Infektes, dem so genannten Pontiac-Fieber, ist vor allem die zweite Verlaufsform, die Legionärskrankheit, eine ernstzunehmende schwere Form der Lungenentzündung, die zu einer lebensbedrohlichen Lungeninsuffizienz führen kann (2, 3). Die pathogene Wirkung der Erreger hängt neben der bakteriellen Belastung des Wassers, der Art der Exposition und der Virulenz des Stammes auch entscheidend vom Immunstatus sowie bereits bestehenden Vorerkrankungen des Betroffenen ab. Besonders ältere Menschen mit Grundleiden wie z. B. Diabetes oder Personen, die unter immunsupprimierender Therapie stehen, an chronischen Lungenerkrankungen leiden oder Patienten mit Tumorerkrankungen zählen zu den Risikogruppen für eine Legionelleninfektion (4). Auch Tabak- und Alkoholkonsum bergen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (4). Generell tritt eine Infektion mit *Legionella* häufiger bei Erwachsenen über 50 Jahren auf. Dabei besteht ein geschlechtsspezifischer Unterschied, da Männer aus bislang noch nicht genau geklärter Ursache deutlich häufiger erkranken als Frauen (4).

Dem Robert Koch-Institut wurden für das Jahr 2011 insgesamt 639 Fälle einer Legionelleninfektion übermittelt. Dies entspricht bundesweit einer Inzidenz von 7,8 Erkrankungen pro einer Million Einwohner ((5); Stand: 21.03.2012). Die ermittelten Fallzahlen repräsentieren jedoch nur einen Bruchteil der tatsächlichen Erkrankungen, da von einer erheblichen Untererfassung ausgegangen werden muss. Dies ist dadurch bedingt, dass das klinische Bild allein keine Rückschlüsse auf den ursächlichen Erreger zulässt. Daher kann die Legionellenpneumonie nur durch spezifische Erregerdiagnostik festgestellt werden. Nach

aktuellen Schätzungen des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien („CAPNETZ“) wird davon ausgegangen, dass in Deutschland knapp 4 % aller ambulant auftretenden Pneumonien durch Legionellen verursacht werden (6). Dies entspräche bei etwa 500.000 ambulanten Pneumonien rund 20.000 Fällen pro Jahr, die einer Legionelleninfektion zuzuschreiben wären (7).

## 1.2 Biologie von *Legionella pneumophila*

### 1.2.1 Mikrobiologie und Ökologie

Legionellen sind ubiquitär verbreitete Umweltkeime, deren primäres Reservoir das Süßwasser ist, wo sie in geringen Mengen natürlicher Bestandteil von Oberflächengewässern und des Grundwassers sind (8). Es handelt sich bei ihnen um Gram-negative, stäbchenförmige und obligat aerobe Bakterien, die polar oder lateral begeißelt sind (1, 9). Gegenwärtig sind 51 Arten mit insgesamt 73 Serogruppen bekannt (10), von denen mindestens 24 mit einer humanen Erkrankung assoziiert vorkommen (11). Annähernd 90 % der Fälle der Legionärskrankheit werden durch *L. pneumophila* verursacht und ungeachtet des Vorkommens von mindestens 15 Serogruppen, ist *L. pneumophila* der Serogruppe 1 für über 84 % der weltweit auftretenden Fälle verantwortlich und besitzt damit für den Menschen die größte Bedeutung (12-14).

Durch ihre komplexen Nährstoffanforderungen sind Legionellen in ihrem natürlichen Habitat von speziellen ökologischen Nischen abhängig, die ihnen Überleben und Replikation ermöglichen. *Legionella* Bakterien sind keine frei lebenden aquatischen Bakterien, vielmehr leben sie parasitär oder in einer Art kommensaler Beziehung mit frei lebenden Amöben im Süßwasser und im Boden (15-17). Durch ihre Lebensweise, sich intrazellulär in einer Vielzahl von Protozoen zu replizieren, genießen Legionellen in der Amöbe Schutz vor für sie schädlichen Umgebungsbedingungen. Diese besondere Beziehung erhöht die Resistenz von *L. pneumophila* gegenüber Bioziden, Antibiotika, Säure, sowie osmotischem und thermalem Stress (18-21). Es gibt sogar bestimmte Amöben-Spezies, die mit einer großen Anzahl *Legionella*-Bakterien gefüllte, Biozid-resistente Vesikel, ausstoßen, die wiederum als luftübertragene Agenzien für die Transmission der Bakterien fungieren könnten (22).

Da Legionellen erst bei Temperaturen zwischen 25 °C und 45 °C und einem Temperaturoptimum von 35 °C gute Bedingungen für ihre Vermehrung vorfinden (23),



stellen sie in ihrem natürlichen Habitat als Umweltkeime in der Regel keine besondere hygienische Gefahr für den Menschen dar. Gelangen die Bakterien jedoch in künstliche, anthropogen erschaffene Warmwasserleitungssysteme, insbesondere große Wassersysteme mit umfangreichen Rohrleitungen, wie sie beispielsweise in Hotels, Krankenhäusern oder vergleichbaren Einrichtungen vorherrschen, steigt die Anfälligkeit für Kontaminationen rapide an, da in diesen Systemen optimale Bedingungen für die Vermehrung der Legionellen gegeben sind. Ebenso kann eine stagnierende Wasserzirkulation zu erhöhten Keimzahlen im Wasser führen. Das Legionellenwachstum wird bei Wassertemperaturen oberhalb von 55 °C gehemmt. Ab einer Temperatur von 60 °C sterben die Bakterien ab (24). Allerdings sind Legionellen durch ihre intrazelluläre Lebensweise innerhalb von Protozoen und durch die Bildung komplexer Biofilme, in denen die Replikation der Legionellen ebenfalls von Wirtsprotozoen abhängig ist (25), besser gegen Desinfektionsmaßnahmen geschützt und können ungünstige Umwelteinflüsse überdauern (26). Für Legionellen im Trinkwasserbereich gilt der „technische Maßnahmewert“ von < 100 CFU/ 100 ml Wasser (maximal akzeptierbare Legionellenkonzentration), der als Orientierung für das Auslösen technischer Präventionsmaßnahmen dient (27).

Die Infektion mit Legionellen erfolgt in der Regel durch Inhalation kontaminierten Wassers in Form von Aerosolen, aber auch durch Aspiration legionellenhaltigen Wassers (4). Dabei spielen als Infektionsquellen vor allem Leitungssysteme zur Warmwasserverteilung beispielsweise in sanitären Einrichtungen, Whirlpools, Schwimmbäder, Zimmerspringbrunnen sowie Kühltürme oder Rückkühlwerke von Lüftungstechnischen Anlagen eine besondere Rolle (8, 28-31). Eine Übertragung der Bakterien von Mensch zu Mensch wurde bislang nicht beobachtet (32, 33), weshalb man sagen muss, dass eine humane Infektion eine Sackgasse für die Replikation der Legionellen darstellt (11). Zusammenfassend ist anzumerken, dass die angestiegene Präsenz großer, von Menschenhand erschaffener Wassersysteme zu einer gesteigerten Exposition des Menschen gegenüber Legionellen und damit zu einer höheren Inzidenz für eine Infektion geführt hat. Ein Konzept zur Prävention erhöhter Keimzahlen von Legionellen in Wassersystemen ist daher neben der Erhitzung des Wassers über 70 °C und der Vermeidung einer Stagnation des Wassers auch die Behandlung mit Chemikalien, wobei der Einsatz von Monochloramin im Vergleich zu Chlor effektiver zu sein scheint, da es einerseits stabiler ist und damit über längere Verteilungssysteme stärker desinfizierend wirkt und zum Anderen auch in der Lage zu sein scheint, besser in Biofilme einzudringen (34).

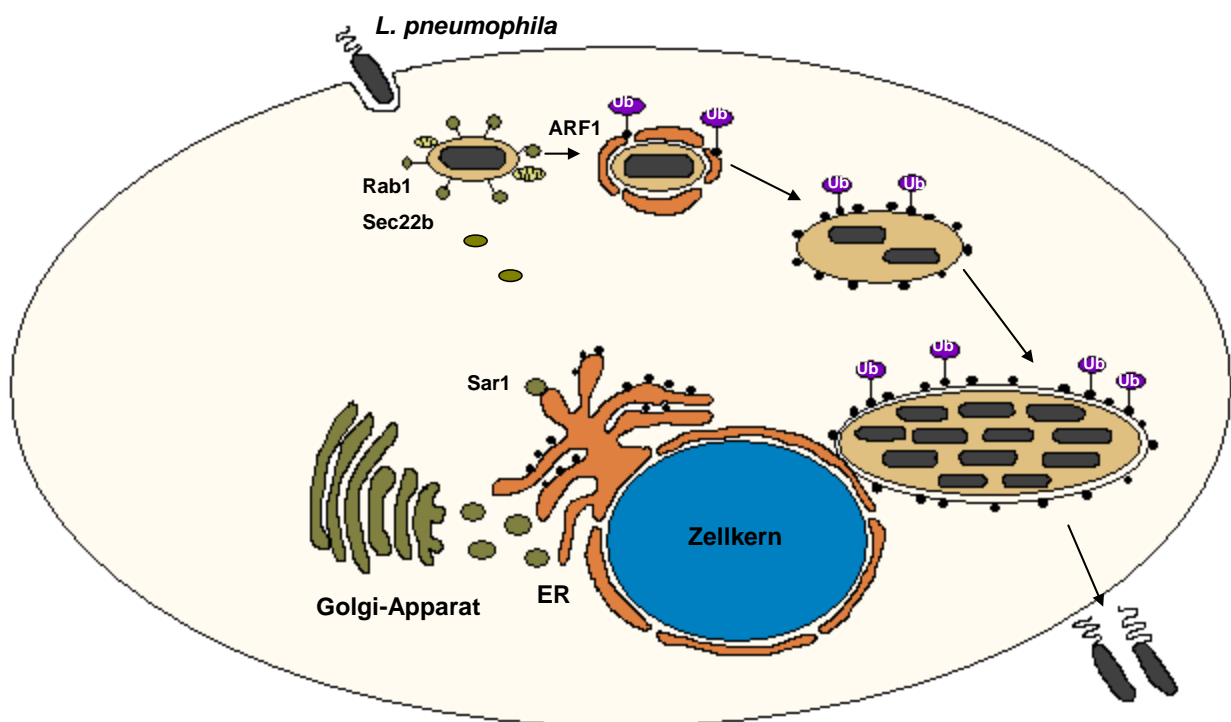
### 1.2.2 Replikation von *Legionella pneumophila* in eukaryotischen Zellen

Die Fähigkeit von *L. pneumophila*, sich in verschiedenen Protozoen wie z. B. *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmanella vermiformis*, *Naegleria spp.* und *Dictyostelium discoideum* zu replizieren, befähigt die Bakterien auch dazu, sich in humanen Alveolarmakrophagen zu vermehren (11). Neben der Verwendung verschiedener Makrophagen-Zelllinien dienen auch HeLa-, A549- und CHO-K1-Epithelzellderivate als Modellsysteme für die Charakterisierung der intrazellulären Nische, die *L. pneumophila* für sich etabliert hat. Für das Studium der Pathogenese der Legionelleninfektion innerhalb seiner in der Umwelt vorkommenden Wirtszellen, bietet sich vor allem *D. discoideum* an, da diese Amöbenart genetisch so modifizierbar ist, dass Wirtsfaktoren, die in die Pathogenese einer Legionelleninfektion involviert sind, durch Mutagenesestudien identifizierbar sind (35).

Beim Generationszyklus der Legionellen sind zwei verschiedene Episoden unterscheidbar, eine „replikative“ und eine „transmissive“ Phase. Die in einer frisch beimpften Laborkultur vorhandenen Bakterien beginnen sich unter dem im Kulturmedium vorhandenen Nährstoffüberschuss durch aktive Zellteilungen zu vermehren. In dieser Phase sind die Stäbchenbakterien durch eine lange, teilweise filamentöse Gestalt sowie Unbeweglichkeit (keine Flagellen) gekennzeichnet. Die zunehmende Verknappung der Nährstoffressourcen vor allem der Aminosäuren im Kulturmedium, die bei *Legionella* die Akkumulation des „Stress-Signalmoleküls“ ppGpp (Guanosin-3',5'-bispyrophosphat) induziert, vermittelt durch dieses Signalmolekül den Übergang in die transmissive oder infektiöse Phase (36). Dies geschieht über die Sigma-Faktoren RpoS und FliA und den *two-component response regulator* LetA/LetS (*Legionella transmission activator/ sensor*) sowie den positiv-Regulator LetE (37-39). In dieser Phase werden verstärkt Gene für die Ausbildung von Transmissionsfaktoren wie z. B. Flagellen oder Pili exprimiert, da LetA/LetS über einen Expressionsanstieg der *small* RNAs RsmY und RsmZ, die wiederum den transkriptionellen Repressor CsrA inhibieren, eine Aktivierung der Gene für die Ausbildung des transmissiven Phänotyps verursacht (40, 41). Die transmissiven Bakterien zeichnen sich daher durch eine stäbchenförmige Gestalt, eine hohe Beweglichkeit, Zytotoxizität und Invasivität aus. Weiterhin sind sie resistent gegenüber Stressfaktoren wie z. B. einem sauren pH-Wert und osmotischem Schock (42).

Die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* beginnt mit der Aufnahme der Bakterien durch konventionelle Phagozytose (s. Abbildung 1.1). Ein weniger verbreiteter, atypischer Mechanismus der „coiling“-Phagozytose, der durch pseudopodiale Strukturen, die die

Bakterien vor Eintritt in die Wirtszelle umschließen, charakterisiert ist (43), wurde zwar für die Aufnahme der Bakterien in Säugerzellen und Amöben beschrieben (43-45), die Bedeutung dieses Prozesses für die Pathogenität von Legionellen ist jedoch aufgrund seiner Assoziation nur mit bestimmten *Legionella*-Spezies fragwürdig (11, 46). Aufgrund der Fähigkeit der Invasion auch nicht-professioneller Phagozyten wie A549, CHO-K1 und HeLa-Zellen, wird die Hypothese unterstützt, dass es sich bei der Aufnahme von *L. pneumophila* um einen durch das Bakterium selbst veranlassten Virulenz-gesteuerten Prozess handelt (47-50). Unter den bakteriellen Faktoren, die in die Invasion der Wirtszelle involviert sind, befinden sich wenigstens fünf Proteine, EnhC, LpnE, RtxA, LvhB2 und HtpB (48, 51-54), obgleich nicht für alle dieser Proteine eine direkte Rolle für den bakteriellen Aufnahmeprozess gezeigt werden konnte. Das am besten charakterisierte Protein dieser Gruppe ist das an der Bakterienoberfläche lokalisierte Chaperonin HtpB/ Hsp60, dessen Expression in Gegenwart eukaryotischer Zellen hochreguliert wird, das nach der bakteriellen Aufnahme in der *Legionella-containing vacuole* (LCV) akkumuliert und zur Rekrutierung von Mitochondrien an die entstehende LCV beitragen könnte (55).



**Abbildung 1.1: Der intrazelluläre Replikationszyklus von *L. pneumophila*.** Nach der Aufnahme des Bakteriums in die eukaryotische Wirtszelle moduliert *L. pneumophila* durch eine Reihe bakterieller Effektoren intrazelluläre Protein-*trafficking* Prozesse, um den endozytotischen Abbau aufgenommener Bakterien zu blockieren und eine intrazelluläre Replikations-Vakuole (LCV) zu etablieren. Dafür ermächtigt sich die LCV

der Wirtsfaktoren Rab1, Sec22b und Sar1 um eine Rekrutierung und Fusion von ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Vesikeln mit der LCV zu erreichen. In der zweiten Phase der Reifung des Phagosoms bewirkt die Modulierung des Wirtspoteins ARF1 eine Fusion von ER-Membranen mit der LCV. Etwa eine Stunde nach Aufnahme der Bakterien lokalisieren ubiquitinierte (Ub) Proteine durch die Wirkung bakterieller Effektoren an der LCV. Nach der Replikation der Bakterien werden diese durch Lyse der phagosomalen und der Wirtszellmembran freigesetzt und können einen neuen Infektionszyklus beginnen [modifiziert nach (56)].

Die LCV ist ein spezifisches Kompartiment, in dem sich die Legionellen nach der Aufnahme in der Wirtszelle replizieren und das deshalb auch als „replikatives Phagosom“ bezeichnet wird (57). Nach der Aufnahme inhibiert *Legionella* die wirtszelleigenen Abwehrmaßnahmen, die normalerweise eine Lyse des phagozytierten Bakteriums durch spezialisierte Zellkompartimente, die Lysosomen enthalten, ein stark saures Milieu sowie eine Reihe spezialisierter Verdauungsenzyme, beinhalten. Die Schlüsselstrategie der Legionellen ist dabei die Inhibition der Verschmelzung von Phagosom und Lysosom (58, 59). Bereits 5 min nach Phagozytose der Bakterien erfolgt die Rekrutierung sekretorischer Vesikel des endoplasmatischen Retikulums (ER) an die LCV (60). Schon bald nach der bakteriellen Phagozytose akkumuliert die LCV Wirtspoteine sekretorischer Vesikel, die zwischen ER und Golgi-Apparat zirkulieren. Dazu gehört neben Sec22b und Sar1 auch Rab1, eine *small* GTPase, die Faktoren rekrutiert, welche für die Fusion von ER-Vesikeln mit dem Golgi-Apparat notwendig sind und die für die Biogenese des Phagosoms wichtig ist (61-63). Die Replikation der Bakterien erfolgt etwa 4-10 Stunden nach Infektionsbeginn in der LCV, deren pH-Wert im neutralen Bereich aufrechterhalten wird (64). Zu diesem Zeitpunkt ist das Phagosom bereits vollständig von mehreren Schichten rauer ER Membran umgeben (65). In infizierten Knochenmarksmakrophagen von A/J Mäusen wurden erst 18 Stunden nach Infektionsbeginn phagolysosomale Marker wie Cathepsin D und eine Ansäuerung des Legionellen enthaltenden Phagosoms nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die phagolysosomale Fusion erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt und auch nur in einigen Zelltypen stattfindet, wenn die Erreger bereits Säureresistenz entwickelt haben (66). Etwa 24 Stunden nach Infektionsbeginn hat sich die Bakterienanzahl im Legionellenphagosom soweit erhöht, dass die Bakterien das Phagosom komplett ausfüllen, was sich in einem drastischen Verbrauch der lokalen Nährstoffreserven niederschlägt. Dies leitet die Expression bakterieller Transmissionsfaktoren (Flagellen, Adhäsine, Toxine) und damit den Übergang der Bakterien von der replikativen in die virulente (zytotoxische, transmissive) Form ein (67). Transmissive Bakterien induzieren eine Kontakt-abhängige Zellzytotoxizität, die durch die Bildung von weniger als 3 nm kleinen Poren in der Wirtszellmembran verursacht wird (68, 69). Erst

kürzlich wurde heraus gefunden, dass diese Poren in Säugetierzellen aus der Aktivierung des Wirtszellinflammassoms durch bakterielles Flagellin resultiert (70). Die intrazellulären Bakterien gelangen in den extrazellulären Raum, können in umgebende Wirtszellen eindringen und einen neuen Infektionszyklus initiieren (s. Abbildung 1.1).

### 1.3 Diagnostik und Therapie einer Legionelleninfektion

Da das klinische Bild einer Pneumonie nicht spezifisch auf eine Infektion mit *Legionella* hindeutet, besitzen mikrobiologische Diagnostikmethoden eine Schlüsselrolle für die Detektion einer Legionelleninfektion. Eine Spezifität von fast 100 % wird durch Kultivierung der Erreger aus Bronchoalveolärer Lavage, bronchialem Aspirat, Lungenbiopsien, Sputum und *postmortem* auch aus Gewebeproben erreicht (33, 71). Der Nachweis durch Kultur auf gepuffertem Aktivkohle-Hefeextrakt (BCYE)-Medium gilt immer noch als „Goldstandard“, da alle *Legionella*-Spezies kultiviert werden können, obwohl nicht-*pneumophila* Spezies auf Laborkulturmedium langsamer wachsen (72). Die wichtigste Technik für die weiterführende Identifikation von Legionellen im klinischen Labor ist die serologische Charakterisierung der Isolate. Dafür wurde ein Fluorescein-konjugierter monoklonaler Antikörper (MAb) gegen ein *Legionella outer membrane protein* entwickelt, der Spezies-spezifisch alle Serogruppen von *L. pneumophila* detektiert (72). Die Serogruppen-Spezifität basiert auf Lipopolysacchariden (LPS) und die Unterteilung in Serogruppen (Sg) auf der Reaktivität mit polyklonalen Antiseren (73). Da über polyklonale Antiseren eine Bestimmung bis zum Spezies-Level kaum möglich ist, wird für die genaue Identifizierung der Isolate eine Sequenzanalyse des *macrophage infectivity potentiator (mip)*-Genes durchgeführt (74). Parallel zur Kultur erfolgt i. d. R. die Detektion eines 10 kDa großen, hitzestabilen *Legionella*-Antigens im Urin infizierter Patienten, eine Methode die ebenfalls sehr spezifisch ist und den Vorteil der Lieferung frühzeitiger Ergebnisse besitzt (72). Abgesehen davon gibt es noch die Möglichkeit einer *Legionella*-Antigen-Detektion über Direkte Fluoreszenz-Antikörper (DFA)-Testung und die Detektion von Antikörpern in humanen Seren mit einem Indirekten Fluoreszenz-Antikörper (IFA)-Test, der allerdings erst bei fortgeschrittener Infektion angewendet werden kann und dadurch limitiert ist, dass etwa 20-30 % aller Patienten keine erhöhten Antikörper-Titer entwickeln (33, 71). Sehr vielversprechend ist die Detektion von *Legionella*-Nukleinsäuren über PCR, da diese Methode neben einer Spezifität von fast 100 % und einer schnellen Durchführung auch den Vorteil bietet, dass alle *Legionella*-Spezies detektiert werden können, weshalb sie in Zukunft weiterentwickelt und vermehrten Einsatz finden wird.

(72). Da keine der beschriebenen Methoden die geforderte Qualität *in puncto* Sensitivität und Spezifität erfüllt, werden in der Praxis verschiedene diagnostische Tests parallel durchgeführt, um schnellstmöglich Resultate im Hinblick auf Identifikation und adäquate Therapie zu erzielen, denn häufig kommt es vor allem auf die Schnelligkeit zur Erzielung eines Ergebnisses an, um frühzeitig therapieren zu können. Das Kompetenznetzwerk „CAPNETZ“ empfiehlt in einer 2009 heraus gegebenen Leitlinie den Antigennachweis aus Urin als diagnostische Methode der Wahl bei Verdacht auf Legionelleninfektion, sowie den Kulturnachweis zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge, während Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren für den Routineeinsatz bislang als noch nicht ausreichend validiert und standardisiert gelten (75).

Eine optimale Therapie gegen *Legionella spp.* basiert auf Antibiotika mit einer hohen intrinsischen Aktivität, einer angemessenen Pharmakokinetik und eines pharmakodynamischen Profils, was die Fähigkeit von Eintritt und Konzentration in phagozytische Zellen und alveolare Exsudate sowie ein geringes Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen einschließt (76, 77). Wurde früher vermehrt Erythromycin für eine Behandlung verwendet, so ist heute der Einsatz neuerer Makrolide wie z. B. Azithromycin oder Clarithromycin und von Fluorchinolonen wie z. B. Levofloxazin weit verbreitet (78). Im Normalfall ist eine Behandlungsdauer von 7 bis 14 Tagen für eine Genesung ausreichend, wobei im Falle einer milden Verlaufsform eine 5-tägige Behandlung mit Azithromycin ebenfalls ausreichend sein kann (79) und die Länge der Therapie im konkreten Fall auf einer individuellen Basis abhängig vom jeweiligen Krankheitsbild bestimmt werden muss.

#### 1.4 Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

Legionellen besitzen eine Reihe bakterieller Pathogenitätsfaktoren, die auch in anderen Bakterien eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören Lipopolysaccharide (LPS), Flagellen, Pili, ein Typ II-Sekretionssystem (T2SS) (s. 2.3.1.1), Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS) (s. 2.3.1.2) sowie weitere Sekretionssysteme und „outer membrane proteins“. Eines der ersten Gene, die mit der Fähigkeit von *L. pneumophila* in eukaryotischen Zellen zu replizieren, assoziiert wurden, war ein Gen, das für die Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase (PPIase) Mip (*macrophage infectivity potentiator*) codiert (80). Dieses Protein wird an die Zelloberfläche exportiert (81) und ist aufgrund seiner PPIase-Aktivität mit der Fähigkeit, die Epithelzellbarriere zu penetrieren, assoziiert (82). Es wird angenommen, dass Mip nach der

Bindung an Kollagen die extrazelluläre Matrix für eine Proteolysereaktion sensibilisiert, indem es die Protease-insensitiven *cis*-Prolyl-Verbindungen in Protease-sensitive *trans*-Prolyl-Verbindungen konvertiert und somit in Zusammenarbeit mit einer bakteriellen oder wirtsspezifischen Serinprotease die extrazelluläre Matrix degradiert (82). Abgesehen von diesem Beispiel spielen für die Pathogenese von *L. pneumophila* eine Reihe weiterer Faktoren und vor allem ein T2SS sowie ein T4SS eine entscheidende Rolle, weshalb sie im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

### 1.4.1 Proteinsekretionssysteme

Um den mannigfaltigen Wirtsabwehrmechanismen innerhalb verschiedener Stadien der Infektion entgegen zu treten, benötigt ein Pathogen ein vielfältiges Arsenal an Effektorproteinen um zelluläre Wirtsprozesse zu beeinflussen und für den eigenen Zweck zu manipulieren oder den Attacken des Wirtes effizient entgegen zu wirken und diese unschädlich zu machen. Typ IV-Proteinsekretionssysteme (T4SS) sind mit der Virulenz vieler wichtiger Pathogene wie *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Brucella spp.*, *Coxiella burnetii* und *Legionella pneumophila* assoziiert (83). Die translozierten Proteinsubstrate dieser Transporter variieren zwischen den verschiedenen Spezies nicht nur in ihrer Funktion sondern auch in ihrer Reichhaltigkeit (84). Ein Typ I-Sekretionssystem (Lss (*Legionella secretion system*)) wurde für *L. pneumophila* ebenfalls beschrieben, wobei für dieses System noch keine Sekretionssubstrate beschrieben wurden und es für die Pathogen-Wirts-Interaktion entbehrlich zu sein scheint (85). Abgesehen davon besitzen Legionellen noch ein Twin-Arginin-Translokations-System (Tat), das den allgemeinen Protein-Sekretionsweg (Sec) ergänzt, indem es gefaltete Proteine durch die innere Membran transportiert. Das Tat-System von *L. pneumophila* leistet auch einen Beitrag zur Biofilmbildung und zur intrazellulären Replikation in Makrophagen und Amöben und ist hilfreich für das Wachstum unter Bedingungen bei denen geringe Eisengehalte vorliegen (86, 87). Unter den Tat-sekretierten Substraten befinden sich eine Phospholipase C, LvrE und eine Cytochrome-*c*-Oxidase, wobei davon ausgegangen wird, dass die Liste der Substrate weitaus länger ist und auch Komponenten des Lss und des Flagellen-Biosynthese-Systems einschließt (86-89). Für die Manipulation der Wirtszellprozesse, ausgehend von einer intrazellulären Vakuole, bedient sich *Legionella* jedoch eines einzigartigen Arsenal aus über 270 Effektorproteinen, die vom Dot/Icm (*defect in organelle trafficking*)/intracellular multiplication) T4SS (s. 1.4.1.2) transloziert werden und von denen viele Ähnlichkeit zu eukaryotischen Proteinen aufweisen

(90-94). Dieses System wird noch durch ein zweites Typ IV-Sekretionssystem, das Lvh (*Legionella vir homologues*)-System, ergänzt, dem eine Rolle in einigen Aspekten der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* zugeschrieben wird, indem es Dot/Icm-Funktionen komplementiert (95).

#### 1.4.1.1 Das *Legionella* Lsp Sekretionssystem

Das *L. pneumophila* Lsp (*Legionella secretion pathway*) Typ II-Sekretionssystem (T2SS) wurde basierend auf der Entdeckung von PilD, einem Homolog der *Pseudomonas aeruginosa* Prepilin Peptidase, die die an der Biogenese der Typ IV-Pili und eines funktionellen T2SS beteiligten Proteine Pilin und die sogenannten Pseudopiline prozessiert (96, 97), erstmalig identifiziert (98). Es ist in vielen, jedoch nicht in allen Gram-negativen Bakterien präsent (99) und sowohl in Pathogenen als auch Nicht-Pathogenen wirksam, wo es in erstgenannten eine wichtige Rolle für die Pathogenese spielt und/ oder zur bakteriellen Fitness in verschiedenen ökologischen Nischen beiträgt (99, 100). Dies wird durch den Export und die zielgerichtete Freisetzung von Toxinen, Proteasen und anderen Enzymen erreicht (99). Das Lsp-T2SS ist kritisch für die intrazelluläre Infektion von Protozoen, fördert die Infektion von Lungenepithelzellen, dämpft die Zytokinfreisetzung infizierter Makrophagen und Epithelzellen und limitiert die Level der Zytokin-Transkripte in infizierten Makrophagen (101, 102).

Beim mehrstufigen Prozess der Typ II-Sekretion werden die sekretierten Proteine, die eine N-terminale Signalsequenz besitzen, zunächst über den Sec- oder Tat-Weg durch die innere Membran transloziert und ins Periplasma entlassen, wo noch ungefaltete Proteine ihre Tertiärstruktur annehmen (99). Anschließend erfolgt eine Translokation der Proteine durch die äußere Membran über den Typ II-Sekretionsapparat, einen Multiprotein-Komplex (101). Der evolutionär mit Typ IV-Pili verwandte Typ II-Sekretionsapparat besteht aus 12 „Kernproteinen“, einer zytoplasmatischen ATPase (LspE), drei Proteinen der inneren Membran (LspF, L und M), die eine Plattform und Bindungsstelle für die ATPase darstellen, Pseudopilinen (LspG, H, I, J und K), die eine den periplasmatischen Raum umspannende Pilus-artige Struktur bilden, eine Peptidase der inneren Membran (LspO), die Pseudopiline vor ihrer Integration in den Sekretionsapparat prozessiert, ein „Sekretin“ der äußeren Membran (LspD), das oligomerisiert und dadurch eine Sekretionspore bildet und schließlich



ein Protein (LspC), das innere und äußere Membrankomponenten zu verlinken scheint (99, 103-107).

Mindestens 25 T2SS-Proteinsubstrate wurden bereits beschrieben (101, 108-110), wobei wie beim Dot/ Icm Typ IV-Sekretionssystem eine funktionelle Redundanz unter den Effektoren herrscht. Unter den zuerst identifizierten Substraten befanden sich saure Phosphatasen, die Phospholipasen A PlaA und PlaC, sowie die Phospholipase C PlcA, eine Ribonuklease und eine Metalloprotease (111-115). Zwei der Schlüsselsubstrate, die Metalloprotease ProA und eine Ribonuklease SrnA, wurden als für eine optimale Infektion von Amöben unbedingt benötigte Effektoren beschrieben (108, 116, 117). Dabei zeigte eine Studie von Rossier und Mitarbeitern, dass ProA, abhängig von der Art der getesteten Amöben, eine unterschiedliche Bedeutung für deren Infektion besitzt, was suggeriert, dass Legionellen einige Faktoren entwickelt haben, um Wirtsprotozoen gezielt zu infizieren (116). Weiterhin zeigte die Analyse der Überstände von *proA*-Mutanten, dass einige Proteine wie PlaC durch die Metalloprotease gespalten und auch aktiviert werden können (112, 115). Neben der Bedeutung des T2SS für das intrazelluläre Überleben in Amöben, spielt dieses Sekretionssystem auch eine wichtige Rolle für das extrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* bei niedrigen Temperaturen (118) und fördert die Sekretion von *surfactant*, das für die Ausbildung eines „*sliding motility*“-Phänotyps verantwortlich ist (110). Interessant ist auch, dass die Effektoren IcmX und LvrE, die in Zusammenhang mit Typ IV-sekretierten Proteinen von *L. pneumophila* stehen (54, 119-121), im Proteom von T2SS-Mutanten fehlen, was eine mögliche Verbindung zwischen diesen Sekretionssystemen suggeriert (101).

#### 1.4.1.2 Das *Legionella* Dot/Icm Sekretionssystem

Das *L. pneumophila* Dot/Icm (*defect in organelle trafficking*)/ *intracellular multiplication*) System stellt eine Besonderheit unter den T4SS dar, da bis zu diesem Zeitpunkt über 270 experimentell bestätigte Proteinsubstrate für dieses System beschrieben wurden (90-94), die rund 10% des *L. pneumophila* Proteoms ausmachen (122-124). Ähnlich wie Effektoren anderer Proteinsekretionstypen, beeinflussen Dot/Icm Substrate verschiedene zelluläre Prozesse des Wirtes, wie z. B. das Vesikeltrafficking, Abläufe im Rahmen des Zelltodes, Ubiquitinierung, Lipidmetabolismus und die angeborene Immunabwehr, um den Aufbau einer intrazellulären Nische für die bakterielle Replikation zu erreichen (56, 125). Komponenten

des *L. pneumophila* Dot/Icm Typ IVB-Proteinsekretionssystems werden nicht nur für die intrazelluläre Replikation und die Etablierung der LCV benötigt, sondern sind unter anderem auch im Prozess des bakteriellen Eintritts in die Wirtszelle, der Inhibition der Wirtszellapoptose und dem Austritt aus der Wirtszelle involviert.

Das Dot/Icm T4BSS ist auf zwei, etwa 20 kb großen, chromosomalen Regionen, eine Region I, die sieben Gene (*icmV*, *W*, *X* und *dotA*, *B*, *C*, *D*), enthält und eine Region II, die 18 *icm* Gene (*icmT*, *S*, *R*, *Q*, *P*, *O*, *N*, *M*, *L*, *K*, *E*, *G*, *C*, *D*, *J*, *B*, *F* und *H*) trägt, codiert (126, 127). Die meisten der *dot/icm* Gene sind essentiell für die intrazelluläre Replikation des Bakteriums in Amöben, Makrophagen und im Meerschweinchenmodell (127, 128). Dafür wurde ein Modell entworfen, das die Komponenten des Dot/Icm-Systems als eine Art „Multiprotein-Apparat“, der die innere und äußere Membran der bakteriellen Zellwand umspannt, abbildet (129). Obwohl bis jetzt kein experimenteller Beweis dafür erbracht wurde, sieht das Modell die Dot/Icm Komponenten eine Pilus-artige Organelle an der bakteriellen Oberfläche formen, die eine Translokationspore in die Wirtszellplasmamembran und die Membran der LCV insertieren soll (129).

Um sich auf die dynamische Infektabwehr des Wirtes einzustellen, können bakterielle Pathogene einige Strategien entwickeln, um eine zeitlich regulierte Aktivität ihrer Virulenzfaktoren zu erreichen. Dies kann zum einen durch Regulation der Expression entsprechender Gene auf transkriptioneller Ebene, ausgelöst durch Umgebungsparameter in den verschiedenen Phasen der Infektion, geschehen. Viele *Legionella* Effektorgene werden zum Beispiel induziert, wenn die Bakterien in die postexponentielle Phase übergehen und bereit sind, Zellen zu infizieren (67). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist das Auftreten von Effektoren, die die Fähigkeit besitzen, die biologische Wirkung anderer Effektoren zu neutralisieren oder in eine andere Richtung zu lenken. Zum Beispiel verursacht das GAP (GTPase-activating)-Protein LepB von *L. pneumophila* eine Umkehrung der durch die Effektoren SidM/ DrrA hervorgerufenen Aktivierung der *small* GTPase Rab1 (130). Ebenfalls besitzt *L. pneumophila* die Möglichkeit bestimmte durch das Bakterium selbst beeinflusste Wege zu inhibieren. Beispielsweise enthalten durch *L. pneumophila* infizierte Zellen, aufgrund des Apoptoseprozesses, der durch das Bakterium selbst induziert wurde, aktive Caspasen 3 und 7. Die Aktivität dieser Enzyme kann jedoch durch IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), die ebenfalls durch *L. pneumophila* selbst induziert werden, gehemmt werden (131-133). Eine durch Kubori et al. (2010) erst kürzlich entdeckte direkte Regulation

der Funktion eines Effektors durch einen anderen Effektor lenkte die vielfältigen Wirkmechanismen bakterieller Effektoren in eine neue Richtung. Der durch das Dot/Icm System translozierte Effektor LubX, eine U-Box-Typ E3 Ubiquitin Ligase, die an die Zielstruktur Wirtskinase Clk1 adressiert ist, polyubiquitiniert den Effektor SidH, ein Paralog zum Effektor SdhA, dessen Wirtsfunktion die Modulierung der Interferoninduktion und den Zelltod beinhaltet (134), und führt diesen damit der proteasomalen Degradation zu (135). LubX wird dabei nur nachdem die initiale Phase der Infektion stattgefunden hat, mit einem Peak der 10 Stunden nach der Infektion erreicht wird, exprimiert und transloziert (135). Dies stimmt mit der Beobachtung, dass das Dot/Icm System für wenigstens 8 Stunden nach der bakteriellen Internalisation aktiv ist, überein (136).

Diese Studien trugen auch dazu bei, einer Erklärung für die Frage, die sich bei der Beschäftigung mit der Pathogenität von *L. pneumophila* immer wieder aufdrängt, näher zu kommen. Warum besitzt dieses Bakterium so viele Effektoren? In einem Review von 2011 zieht Luo mindestens zwei Modelle zur Erklärung dieses Phänomens heran (84). Erstens ruft die Inaktivierung von Genen, die für Dot/Icm Effektoren codieren, in den meisten Fällen nur einen mäßigen Defekt auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit hervor, weshalb man von einer funktionellen Redundanz unter den Effektoren und dem Vorhandensein mehrerer Paraloge ausgeht (137). Zweitens scheint eine Vielzahl von Effektoren für die erfolgreiche Kolonisation der taxonomisch sehr verschiedenen Wirtsprotozoen notwendig zu sein (84). Es ist anzunehmen, dass aufgrund der hohen Komplexität an Interaktionen zwischen *L. pneumophila* und seinen Wirten, auch in Zukunft noch weitere Effektoren und Regulationsmechanismen, die Aktivität dieser Effektoren betreffend, aufgedeckt werden.

### 1.5 Hämolyse-assoziierte Faktoren bei *L. pneumophila*

Zytolysine, die in der Lage sind, Erythrozyten zu lysieren, werden gemäß der Einteilung nach dem Zelltyp, den sie zerstören, auch als Hämolsine bezeichnet. Entsprechend einer durch Rowe und Welch vorgenommenen Einteilung können Zytolysine in drei Gruppen unterteilt werden: (i) Zytolysine, die durch enzymatische Zerstörung der Wirtszellmembran zur Lyse der Zelle führen, (ii) Hämolsine, die als Detergenzien auf die Wirtszellmembran wirken und (iii) porenbildende Zytolysine, die in der Wirtszellmembran Poren insertieren (138). Die Vorteile, die der Einsatz von Zytolysinen für ein Pathogen bietet, können sehr vielfältig sein und umfassen neben der Freisetzung von intrazellulärem Eisen aus Erythrozyten durch

Hämolyse und des damit verbundenen Benefits für das eigene Wachstum, auch eine Gewebszerstörung und Dissemination des Pathogens sowie die Zerstörung von Zellen des Immunsystems, die eine Ausschaltung der Abwehrmechanismen der Wirtszelle darstellt.

*Legionella pneumophila* produziert neben Exotoxinen, Zytolysinen und Proteasen auch eine Reihe von Hämolysinen, die Wirtszellen wie Erythrozyten oder Gewebekulturzellen zerstören können. Vor allem für die Fähigkeit von *L. pneumophila* durch Porenbildung und Lyse sowohl der phagosomalen als auch der Wirtszellmembran aus der replikativen Vakuole ins Zytoplasma und anschließend ins benachbarte Gewebe zu gelangen, spielen zytolytische Faktoren eine besondere Rolle. Dazu gehören neben Phospholipasen (s. 1.6), die eine Invasion von *L. pneumophila* z. B. durch die Zerstörung der natürlichen Barriere des Lungensurfactants unterstützen auch sekretierte Proteasen und weitere porenbildende zytolytische Proteine wie z. B. ein Vertreter der RTX (*repeats in structural toxin*)-Proteine, als deren Prototyp das Hämolysin A (HlyA) von *Escherichia coli* gilt (139). Das *L. pneumophila* RTX-Protein wird durch das Gen *rtxA* codiert und ist neben einer Beeinflussung der Invasion und Replikation in Monozyten auch in die Fähigkeit zur Porenbildung und Zytotoxizität involviert (51). Einen starken Defekt bei der kontaktabhängigen Porenbildung, der mit Hilfe eines Hämolyseassays bestimmt wurde, wiesen sogenannte *rib* (*release of intracellular bacteria*)-Mutanten von *L. pneumophila* auf (140), bei denen eine Punktmutation im *icmT*-Gen für die starke Attenuierung beim Austritt aus der Wirtszelle verantwortlich war (141).

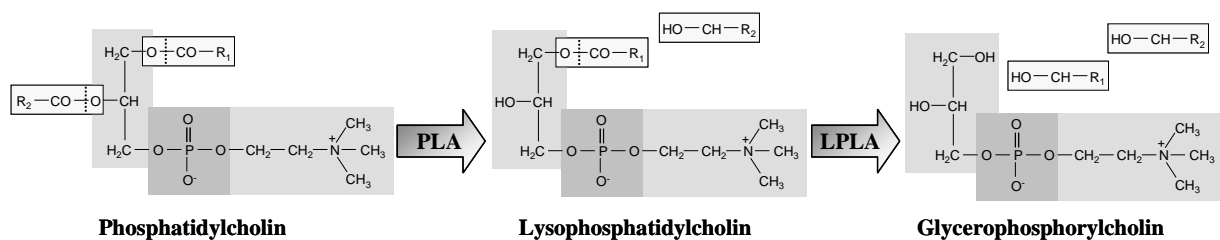
Die Beobachtung, dass *L. pneumophila* Kulturen Säugetiererythrozyten im Agarmedium lysieren, wurde im Jahre 1979 durch Baine und Mitarbeiter gemacht (142). Bereits sehr früh wurde in *L. pneumophila* das Vorhandensein einer extrazellulären Protease beschrieben (143), die als 38 kDa große Zinkmetalloprotease, ProA, mit hämolytischem Effekt auf Kaninchenerythrozyten und einem zytotoxischen Effekt auf CHO-Zellen charakterisiert wurde. Die hämolytische Wirkung erstreckte sich allerdings nicht auf humane Erythrozyten (144). Die Beobachtung, dass ProA als ein Polypeptid für drei unterschiedliche Phänotypen (Proteolyse, Hämolyse und Zytotoxizität) verantwortlich ist, wurde damals als neu unter den bakteriellen Proteasen eingestuft (145). Des Weiteren wurde ein neues Hämolysin mit dem Namen Legiolysin (Lly), das humane Erythrozyten, sowie rote Blutkörperchen von Meerschweinchen und Hund lysiert und sowohl für die Bildung einer braunen Pigment-

artigen Substanz als auch für Fluoreszenz verantwortlich ist, aber keine proteolytische oder zytolytische Aktivität besitzt, identifiziert (146).

Die in Säugetiererythrozyten prädominant vorkommenden Lipide sind Cholesterol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin (Lezithin) und Sphingomyelin (147). Ein unterschiedliches Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Sphingomyelin zwischen den verschiedenen Spezies kann unter anderem für die unterschiedliche Empfänglichkeit der Erythrozyten gegenüber einer Lyse durch bakterielle Phospholipid-hydrolysierende Toxine verantwortlich sein (148). Da Phosphatidylcholin in den meisten Prokaryoten nicht vorhanden ist, aber das am häufigsten vorkommende Phospholipid in *L. pneumophila* darstellt (149), ergibt sich für dieses Bakterium die Notwendigkeit der Produktion einer Vielzahl von Enzymen, die diese Substanz metabolisieren. Zur Identifikation neuer zytolytischer Faktoren können *in vitro* Hämolyseassays genutzt werden, da sich die zytolytische Wirkung der Hämolsine oft auch auf andere Zelltypen erstreckt.

### 1.6 Pathogenitätsfaktor: Phospholipasen A bei *L. pneumophila*

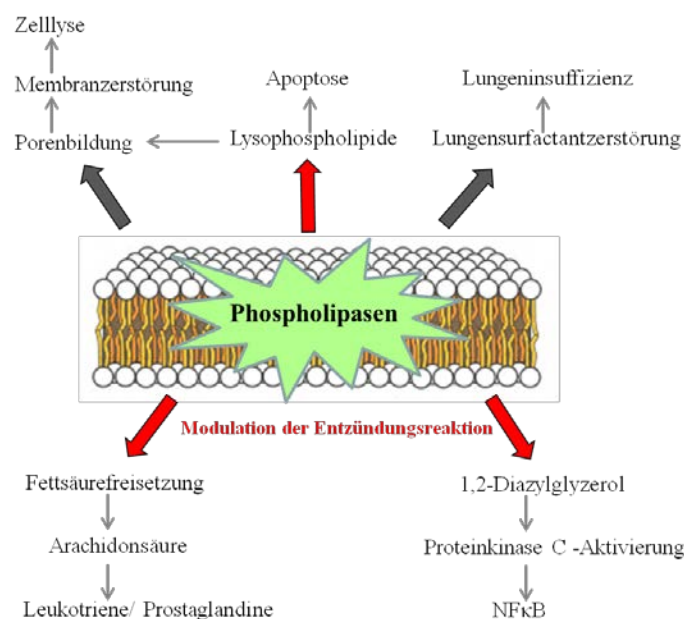
*Legionella pneumophila* besitzt eine Vielzahl verschiedener Phospholipasen, die wichtige Virulenzfaktoren für das Bakterium darstellen. Sie können basierend auf ihrer Spaltposition innerhalb eines Phospholipides in vier Hauptgruppen A, B, C und D klassifiziert werden. Für das intrazelluläre Lungenpathogen *L. pneumophila* spielen vor allem Phospholipasen A (PLA) eine dominante Rolle. Phospholipasen A hydrolysieren die Azylesterbindung entweder an der *sn*-1 oder *sn*-2 Position des Lipidmoleküls und setzen die veresterten Fettsäuren frei (s. Abbildung 1.2). Bei diesem Prozess entsteht ein zytotoxisch wirkendes Lysophospholipid, dass durch Lysophospholipaseaktivität A (LPLA) weiterführend in die verbleibende Fettsäure und den Glycerol-Phosphoesterrest hydrolysiert werden kann.



**Abbildung 1.2: Spaltung von Phosphatidylcholin (PC) durch Phospho-/ Lysophospholipasen A.** In einer 2-stufigen Reaktion wird zunächst durch Phospholipase A-Aktivität in einer hydrolytischen Reaktion eine

Fettsäure vom Glycerol-Rückgrat des Phospholipides abgespalten. Das verbleibende toxische Zwischenprodukt Lysophosphatidylcholin wird anschließend durch Lysophospholipase A-Aktivität unter hydrolytischer Spaltung einer weiteren Fettsäure in Glycerophosphorylcholin umgewandelt [modifiziert nach (150)].

In ihrer Wirkung als Virulenzfaktoren pathogener Bakterien besitzen Phospholipasen oftmals ein hohes zytotoxisches Potential. Neben der Hydrolyse von Membranphospholipiden und der Bildung von Poren, die in einer Zerstörung der Integrität von Zellstrukturen resultieren, spielt auch die Lyse phagolysosomaler Membranen zur Förderung des intrazellulären Überlebens eine wichtige Rolle (151, 152) (s. Abbildung 1.3). Nach Abschluss der bakteriellen Replikation sind die Lyse der Wirtszelle und die damit verbundene Ausbreitung der Bakterien ein weiterer Effekt der Phospholipasen. In der Lunge können *Legionella* Phospholipasen das Lungensurfactant, eine Phospholipideinzelschicht, die die Alveolen auskleidet und für die Stabilität der Lunge essentiell ist, zerstören (153), was zu einer Dysfunktion und zum Kollaps der pulmonaren Alveoli führen kann (154). Weiterhin spielen die durch Phospholipaseaktivität generierten *second messenger* wie 1,2-Diazylglycerol, Arachidonsäure oder Lysophosphatidylcholin eine wichtige Rolle bei der Manipulation oder Interferenz von Wirtszell-Signaltransduktionskaskaden (155, 156), sowie der Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge oder dem Prozess der Apoptose (157, 158). Die häufigsten Substrate von Phospholipasen in Säugerzellen sind Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SM) (159).



**Abbildung 1.3: Wirkungen bakterieller Phospholipasen als Virulenzfaktoren.** Direkte Effekte von Phospholipasen sind die Hydrolyse von Phospholipiden der Zellmembran, die für das Verlassen des Phagosoms

und der Wirtszelle notwendig sein können, aber auch eine Zerstörung des Lungensurfactants, die zu einer Lungenfunktionsstörung führen kann. Abgesehen davon können auch *2nd messenger* wie Lysophospholipide, die Apoptose auslösen und die Entzündungsreaktion modulieren können (gekennzeichnet durch rote Pfeile), Fettsäuren (Arachidonsäure) und 1,2-Diazylglyzerol, ein *2nd messenger*, der durch Proteinkinase C-Aktivierung eine Modulation zellulärer Funktionen durch Aktivierung proinflammatorischer Gene hervorruft, generiert werden.

Im Genom von *L. pneumophila* sind bis jetzt wenigstens 15 verschiedene für Phospholipasen A-codierende Gene, die in drei Hauptgruppen unterteilt werden können, vorhanden (150). Die erste Gruppe beinhaltet die sekretierten *Legionella* Phospholipasen A PlaA und PlaC, die zur GDSL-Lipasefamilie gehören, ebenso wie die Phospholipase A PlaD. Innerhalb dieser Gruppe stellt PlaA die hauptsächlich sekretierte Lipase mit überwiegender LPLA Aktivität dar, die essentiell für die Detoxifikation zytotoxischer Lysophospholipide ist (115). Eine Besonderheit besitzt PlaC, die neben ihrer PLA- und LPLA-Aktivität eine zuvor vom Lipid abgespaltene Fettsäure zu Cholesterol, eine Hauptkomponente eukaryotischer aber nicht prokaryotischer Membranen, transferiert (112). Sowohl PlaA als auch PlaC werden über das T2SS (Lsp) (s. 2.4.1.1) sekretiert (112, 114, 160), wohingegen PlaD, die dritte Phospholipase dieser Gruppe, kein Sec-Signalpeptid besitzt und der Sekretionsweg damit noch unbekannt ist (150). Neben diesen PLA der GDSL-Lipasefamilie, besitzt *L. pneumophila* auch eine zellassoziierte PLA, PlaB, die die stärkste phospholipolytische Aktivität besitzt, die bis dahin für dieses Bakterium beschrieben wurde (161). PlaB zeigt weiterhin auch LPLA- und hämolytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten (161, 162). Die dritte Gruppe der *Legionella* PLA stellen die Patatin-ähnlichen Phospholipasen (PLP) dar, aus deren Gruppe eine PLP in dieser Arbeit näher untersucht wurde und die deshalb in Abschnitt 2.6 detaillierter beschrieben wurden.

### 1.6.1 Patatin und Patatin-ähnliche Phospholipasen

Proteine, die eine Patatin-like Domäne besitzen, sind in eukaryotischen und prokaryotischen Organismen verbreitet und partizipieren an einer Vielzahl biologischer Prozesse, einschließlich Sepsisinduktion (163), Wirtskolonisation (164), Triglyzeridmetabolismus (165) und Membran *trafficking* (166). Aufgrund der Tatsache, dass prokaryotische PLP den eukaryotischen Paralogen im Vergleich zu anderen bisher charakterisierten bakteriellen Lipasen ähnlicher erscheinen (167), ist der Ursprung in einem gemeinsamen Vorfahren mit einer nachfolgenden Modifikation, um die spezifische Lebensweise eines Organismus zu

unterstützen, wahrscheinlich. Deshalb ist anzunehmen, dass Proteine mit Patatin-like Domänen eine einzigartige Superfamilie fernab aller anderen lipolytischen Familien repräsentieren (168).

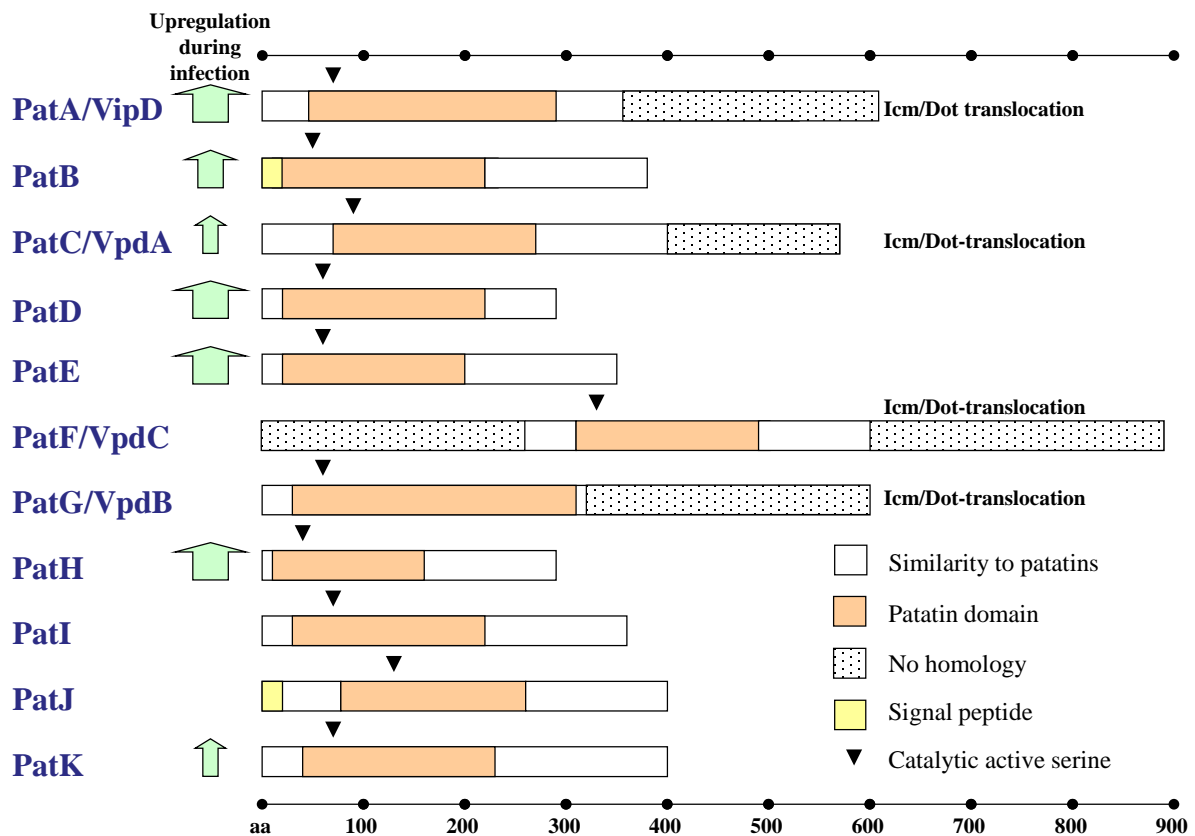
Das Patatin-Glykoprotein ist eine nichtspezifische Lipidazylyhydrolase, die in hoher Konzentration in Kartoffelknollen vorkommt (169). Für Patatin wurde neben einer Rolle in pflanzlichen Signalkaskaden (170), auch die Spaltung von Fettsäuren aus Membranlipiden (170) und die Mitwirkung bei der Abwehr von Pflanzenparasiten beschrieben (171). Camera et al. postulierten für das *Arabidopsis* Patatin-like Protein 2 (PLP2) sowohl eine essentielle Rolle bei der Ausführung des Zelltodes, als auch differenzielle Effekte auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen. Für die Pathogen-induzierte Patatin-like Lipidazylyhydrolase PLP2 wurde gezeigt, dass diese den Zelltod fördert und die Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber des Pilzes *Botrytis cinerea* und des Bakteriums *Pseudomonas syringae* negativ beeinflusst (172). In Kontrast dazu steht ein Beitrag der PLP2 zur Resistenz gegenüber des *Cucumber mosaic virus* (172), d. h. es bestehen gegensätzliche Einflüsse der PLP2 auf verschiedene Pathosysteme, die auch durch differentielle Effekte bei der Induktion von abwehrspezifischen Genen reflektiert werden.

Bisher wurden nur wenige PLP in Bakterien charakterisiert. Dazu gehören neben ExoU und PlpD von *Pseudomonas aeruginosa*, YvdO von *Bacillus subtilis* und RT0522 von *Rickettsia typhi*, VipD/PatA, VpdA/PatC, VpdB/PatG, VpdC/PatF und PatD von *L. pneumophila* (166, 173-179). Bakterielle PLPs bestehen aus vier konservierten Regionen mit Proteinhomologien, die in den Blöcken I bis IV organisiert sind. Gemeinsam mit eukaryotischen Patatinen besitzen prokaryotische PLPs mehrere nahe des N-Terminus gelegene Glycine (meistens drei) in Block I und eine katalytische Diade, die aus einem Serin (GxSxG-Motiv) in Block II und einem Aspartat (DGx-Motiv) in Block IV besteht (167, 169). Eine Besonderheit bei eukaryotischen Patatinen und der verwandten eukaryotischen, zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> ist das Vorhandensein eines zusätzlichen konservierten Serins in Block IV. Block III beinhaltet ein konserviertes Prolin, das bei eukaryotischen Patatinen in einem AAP-Motiv, bei prokaryotischen PLPs dagegen in einem ASxxxP-Motiv organisiert ist (167, 180).



### 1.6.1.1 Patatin-ähnliche Phospholipasen von *L. pneumophila*

Die Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) stellen neben den GDSL-Hydrolasen und der zellassoziierten Phospholipase PlaB eine dritte Gruppe von Phospholipasen A bei *L. pneumophila* dar. Proteine mit Patatindomänen können in allen taxonomischen Reichen gefunden werden. Innerhalb der Bakterien besitzen insbesondere die Genome pathogener, sich intrazellulär vermehrender, oder symbiontischer Mikroorganismen eine Vielzahl an Genen, die für PLP codieren (167). Dabei ist *L. pneumophila* mit 11 PLP (PatA-K) derzeit das Bakterium mit der höchsten genomischen Dichte an PLP (3,74 PLP pro 1000 offenen Leserastern (ORF)), gefolgt von *Rickettsia prowazekii* mit 2 PLP (2,5 PLP/ 1000 ORFs) und *Mycobacterium tuberculosis* mit 8 PLP (2,04 PLP/ 1000 ORFs) (150, 167) (s. Abbildung 1.4). Durch gezielte Suche nach *L. pneumophila*-Genen, die nach Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Veränderungen des Vesikeltrafficking hervorriefen, wurden die Typ IVB-Effektoren VipA, VipD und VipF, von denen VipA und VipF allerdings keine Patatin-ähnlichen Proteine sind, gefunden und erhielten dadurch eine alternative Bezeichnung (Vip, VPS (Vacuole protein sorting) inhibitor protein) (166). Drei weitere zu PatA/VipD homologe PLP, PatC/VpdA, PatF/VpdC, PatG/VpdB, die abhängig vom Typ IVB-Sekretionssystem transloziert werden, wurden ebenfalls beschrieben (94, 177). Diese enthalten neben der Patatindomäne zusätzliche Proteinbereiche, die vorrangig die C-Termini betreffen und keine Homologie zu bekannten Proteinen zeigen. Interessant ist auch, dass die Gene für sieben der PLP von *L. pneumophila* während einer Infektion mit *Acanthamoeba castellanii* von der replikativen bis zur transmissiven Phase verstärkt abgeschrieben werden und davon die Gene für die vier Proteine PatA/ VipD, PatD, PatE und PatH sogar ca. 8-11-fach (67), was für diese PLPs eine wichtige Funktion für das intrazelluläre Überleben und die damit verbundenen Prozesse der Nährstoffaquirierung, des bakteriellen Austritts aus der Wirtszelle und den Beginn eines neuen Infektionszykluses vermuten lässt.



**Abbildung 1.4: Übersicht der Proteine mit Patatin-Domäne in *L. pneumophila* Philadelphia-1.** Die Patatin-Domäne erstreckt sich über einen Bereich vom Oxyanionenloch bis zum putativen katalytisch aktiven Aspartat. Das katalytisch aktive Serin ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Weiße Bereiche markieren in Patatinen konservierte Bereiche außerhalb der katalytischen Domänen. Der gepunktete Bereich gibt Domänen ohne Homologie zu bekannten Proteinen an. PatA/VipD, PatC/VpdA, PatF/VpdC und PatG/VpdB wurden bereits beschrieben (94, 166, 177). Der auf den Proteinennamen folgende Pfeil illustriert die Stärke der Hochregulation der Transkription des entsprechenden Gens bei einer Infektion von *Acanthamoeba castellanii* mit *L. pneumophila* beim Vergleich des 8 h- und 14 h-Infektionszeitpunktes (67). (Flieger, nicht publiziert)

Aus der Gruppe der *L. pneumophila* PLPs wurde bis jetzt nur für PatD eine zellassozierte, enzymatische Aktivität publiziert, die sowohl PLA- als auch LPLA-Aktivität beinhaltet und zu etwa 20% zur gesamten zellassozierten Aktivität beiträgt (176). Das *patD*-Gen ist in einem Operon mit *bdhA*, das für ein Protein mit signifikanter Volllängenhomologie zur 3-Hydroxybutyrat (3-HB) Dehydrogenase BdhA von *Sinorhizobium* sp. codiert, organisiert (176, 181). Dieses Protein oxidiert depolymerisiertes Polyhydroxybutyrat (PHB), ein wichtiges Speicherlipid von Bakterien, zu Azetoazetat und wirkt damit entscheidend bei der Metabolisierung von Energiereserven mit (181). Obwohl eine *bdhA/patD*-Mutante höhere Gehalte an PHB-Granula akkumuliert, was eine Funktion des Operons im PHB-Stoffwechsel suggeriert, ist nicht klar, ob PatD direkt zur PHB-Spaltung beiträgt, indem das Protein z. B. als PHB-Depolymerase, die PHB in 3-HB-Monomere spaltet, wirkt (176). Während die

Aktivität von PatD mit dem Bakterium assoziiert vorliegt, d. h. das Protein ist möglicherweise im Zytoplasma oder der inneren Membran präsent, wo es innerhalb des Bakteriums an Speicherlipidmetabolismusprozessen mitwirkt, so werden die Effektoren VipD/PatA, VpdA/PatC VpdB/PatG und VpdC/PatF über das Dot/Icm T4BSS direkt in die Wirtszelle sezerniert (94, 166, 177). Die Zielstrukturen der Proteine sind allerdings bisher noch unbekannt und auch für die Aufklärung der Bedeutung der PLPs für die Wirtszellinfektion ist noch erheblicher Forschungsbedarf notwendig. Bekannt ist, dass Einzel-*knockout*-Mutanten in den Genen *vipD*, *vpdA*, *vpdB* und *vpdC* aber auch eine *knockout*-Mutation in allen vier Genen, keine Defekte im Makrophagen-Infektionsmodell zeigen, was wiederum die Bedeutung des Vorteils einer funktionellen Redundanz unter den *L. pneumophila* Effektoren hervor hebt (177). Dagegen zeigt eine *bdhA/patD-knockout*-Mutante einen schweren Infektionsdefekt sowohl in Makrophagen als auch in Amöben, der annähernd mit einem Defekt wie ihn eine *dot/icm*-Mutante zeigt, vergleichbar ist (176). Es ist allerdings nicht bekannt, ob diese Mutante auch einen Defekt beim Export von Effektorproteinen aufweist und da die genaue Rolle von PatD für den Prozess der PHB-Spaltung nicht genau geklärt wurde, lässt sich die Bedeutung dieser PLP für die Wirtszellinfektion auch nur erahnen. Die bereits erwähnte zuerst charakterisierte PLP-Hydrolase ExoU von *Pseudomonas aeruginosa* wurde dagegen bereits umfassend erforscht und da sie ein wichtiger Virulenzfaktor für das Bakterium ist, wird sie im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

#### 1.6.1.2 Die PLP ExoU von *Pseudomonas aeruginosa* als Pathogenitätsfaktor

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommendes, opportunistisches, pathogenes Bakterium, das sowohl Menschen als auch Pflanzen infizieren kann. Vor allem in immunkomprimierten und Cystische Fibrose-Patienten werden durch *P. aeruginosa* mit einer Hospitalisierung verbundene Erkrankungen wie Pneumonie und Sepsis hervorgerufen (182), die mit einer Infektion des respiratorischen Epitheliums und der Ausbreitung mit dem Blutstrom aufgrund einer extensiven zytolytischen und Wirtszell-manipulativen Fähigkeit dieses Pathogens einhergehen (183). Abgesehen von mindestens drei PLCs (184-186), besitzt *P. aeruginosa* ein Typ III-Sekretionssystem (T3SS), das die Effektoren ExoS, ExoT, ExoU und ExoY direkt ins Zytosol der eukaryotischen Wirtszelle sezerniert (187). ExoU stellt aus dieser Gruppe das potenteste Zytotoxin, wirksam gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen, dar (163, 179, 188, 189). Deletionsstämme im *exoU*-Gen besitzen keine

detektierbare zytolytische Aktivität mehr und sind nicht mehr in der Lage, Epithelzellschäden hervorzurufen (188). Bekannt ist weiterhin, dass ExoU zu den PLPs mit PLA- und LPLA-Aktivität gehört und eine weit reichende Substratspezifität besitzt (178, 179, 190). Wird das Protein jedoch rekombinant exprimiert, zeigt es keine nachweisbaren lipolytischen Fähigkeiten mehr (179). Erst nach Exposition mit eukaryotischem Zellextrakt konnte die lipolytische Aktivität wieder hergestellt werden, was auf der Abhängigkeit der ExoU-Enzymaktivität vom eukaryotischen Cofaktor Superoxiddismutase beruht (191). ExoU besitzt ebenfalls Homologie zur humanen zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) und zur Calcium-unabhängigen PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) (178, 179), die Fettsäuren von der sn2-Position des Phospholipides und damit die in Säugetierzellen bevorzugt an dieser Position befindliche Arachidonsäure abspalten. In Folgereaktionen kommt es zur Akkumulation von Prostaglandinen und der damit verbundenen Induktion inflammatorischer Prozesse (192). Prostaglandine sind Mediatoren für einen Anstieg der vaskulären Permeabilität, was wiederum ideale Konditionen für die Ausbreitung des Pathogens im angrenzenden Gewebe und den Blutstrom bietet. Zusätzlich zur Freisetzung von Lipid-Vorläufermolekülen beeinflusst die enzymatische Aktivität von ExoU auch das *Signaling* in Epithelzellen über die Aktivierung des c-Jun N-terminalen Kinaseweges, der mit der Freisetzung von IL-8 über den Transkriptionsaktivator AP-1 verbunden ist und damit einen zweiten Weg zur Beeinflussung der Entzündungsantwort darstellt (193). ExoU ist somit ein interessantes Beispiel für eine PLP, die durch ihre potente PLA-Aktivität sowohl eine direkte Membranzerstörung durch Phospholipidhydrolyse als auch in sublytischen Konzentrationen eine Initiierung der Entzündungsreaktion hervorrufen kann.

#### 1.6.1.3 Die PLP VipD/PatA von *Legionella pneumophila*

Wie bereits erwähnt ist VipD/PatA eines der in *L. pneumophila* Philadelphia-1 codierten PLP, das bereits in zwei voneinander unabhängigen Studien identifiziert wurde. Shohdy und Mitarbeiter beschrieben eine Störung des späten sekretorischen Weges, nach Überexpression von VipD (*vacuolar protein sorting inhibitor protein*) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (166). Weiterhin wurde festgestellt, dass VipD/PatA sowohl Homologie zu eukaryotischen Phospholipase A<sub>2</sub>-Proteinen und zu ExoU von *Pseudomonas aeruginosa* (s. 2.6.1.2) besitzt (166). Im Gegensatz zur unmittelbar folgenden stark zytotoxischen Wirkung von ExoU wird die Expression von VipD/PatA in der Hefe *S. cerevisiae*, abgesehen von einem etwas

langsameren Wachstum bei Überexpression, jedoch gut toleriert. Vielmehr wurde beobachtet, dass die Expression einer VipD-Variante ohne die Patatin-Domäne verglichen mit dem Volllängenprotein eine stärkere Störung des späten sekretorischen Vesikeltransports hervorruft (166). Im Falle von ExoU basieren die toxischen Effekte auf der Phospholipase-Domäne des Proteins (194), während der C-Terminus für eine Lokalisation von ExoU an der Plasmamembran der Wirtszelle verantwortlich ist (195). VipD wurde in einem *Screen* auf Proteine, die über das Dot/Icm-System in rezipiente Bakterienzellen transloziert werden, entdeckt (90) und auch eine Fusion mit der Adenylat-Cyclase aus *Bordetella pertussis* bestätigte für VipD eine Translokation über das Typ IVB-Sekretionssystem (T4BSS) (s. 1.4.1.2) (166). Die Induktion von VipD erfolgt während der postexponentiellen bzw. frühen stationären Phase, d. h. wenn *L. pneumophila* am virulentesten ist, was den Rückschluss auf eine Verbindung zu anderen mit der Pathogenese assoziierten Faktoren zulässt (177). Dies wurde auch durch einen Vergleich der Genexpression zwischen der frühen exponentiellen Phase und der stationären Phase im Infektionsmodell mit *Acanthamoeba castellanii*, in der eine 11-fach verstärkte Expression von VipD/PatA ermittelt wurde, bestätigt (67).

Der molekulare Wirkmechanismus, der die Ursache für die in der Hefe verursachte Vesikeltransportstörung sowie die milde Zytotoxizität des Proteins aufklären könnte, wurde nicht gefunden. Ebenso konnten Van Rheenen und Mitarbeiter keine enzymatische Aktivität und damit auch keine biochemischen Eigenschaften und potenzielle Substrate für VipD/PatA bestimmen (177). Auch die Bedeutung der Patatin-Domäne, sowie die intrazelluläre Lokalisation und mögliche Cofaktoren oder Interaktionspartner wurden noch nicht beschrieben.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms des Lungenpathogens *Legionella pneumophila* war der Grundstein für die Identifizierung vieler, für putative Virulenzfaktoren codierende Gene durch Vergleich mit bereits charakterisierten Genen anderer pathogener Bakterien gelegt. Gene, die für putative zytolytische Proteine von *L. pneumophila* sowie deren Regulatoren codieren, können eine besondere Bedeutung für den intrazellulären Replikationszyklus und die Ausbildung einer Legionellose besitzen. Die Aktivitäten der entsprechenden Proteine reichen von direkter Zell- und Gewebeerstörung über indirekte Effekte durch die Generierung von Sekundärprodukten, die verschiedene Wirtszellprozesse

modulieren und zur Pathogenität von *L. pneumophila* beitragen können. Ziel der Arbeit war deshalb die Identifikation neuer zytolytischer Faktoren. Dazu sollte ein Agarplatten-Screening zur Detektion der hämolytischen, lipolytischen und proteolytischen Aktivität von *L. pneumophila* Transposon-Mutanten genutzt werden. Eine Auswahl von Mutanten sollte anschließend durch *in vitro* Hämolyseassays, die ein Indikator für die Zytotoxizität eines Proteins sein können, und im Infektionsmodell mit *Acanthamoeba castellanii* näher untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte einer dieser potentiell zytolytischen Faktoren, die Patatin-ähnliche Phospholipase A VipD/PatA charakterisiert werden, da sie zu einer bisher nicht näher charakterisierten Gruppe von Phospholipasen A, den Patatin-ähnlichen Phospholipasen, gehört und Homologie zum bereits charakterisierten, potenten Zytotoxin ExoU von *Pseudomonas aeruginosa* besitzt. Dazu sollte zunächst die hämolytische und lipolytische Aktivität sowie das *in vitro* Substratspektrum des Proteins evaluiert werden. Weiterhin gab es in Vorarbeiten bereits Hinweise darauf, dass das Protein nach ektopischer Expression in eukaryonten Wirtszellen an der Zytoplasmamembran lokalisiert, wofür die C-terminale Hälfte des Proteins eine essentielle Rolle zu spielen scheint (196). Die Bestimmung welche C-terminale Region die Lokalisation von VipD/PatA an der Zytoplasmamembran bedingt, war ein vorrangiger Punkt für den zweiten Teil der Arbeit. Außerdem sollte die Lokalisation des Proteins auch während einer Infektion eukaryonter Wirtszellen bestimmt werden. Da vermutet wurde, dass für die Lokalisation von VipD/PatA auch eukaryonte Proteine eine Rolle spielen könnten, sollten durch einen Pull Down-Assay mögliche eukaryonte Interaktionspartner von VipD/PatA identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborausstattung

**Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise	Tecan
Chemilumineszenzimager	Chemismart 3000	Vilber Lourmat
Brutschränke	a) B20	Heraeus
	b) HeraCell 240	Heraeus
Drehrad	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab
Dünnschichtkammer	DC-Glastank (Maße: 35×25×12 cm)	Desaga
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life Technologies
FPLC	ÄKTAprime	Amersham Bioscience
Gelelektrophorese-Apparaturen	a) Gelkammer (Mini) SubCell GT	Bio-Rad
	b) Spannungsgerät PowerPack 300	Bio-Rad
	c) Mini Protean 3	Bio-Rad
Heizschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Hochdruckhomogenisator	EmulsiFlex-C3	Avestin Europe
Inkubatoren	a) InnovaTM 4230	New Brunswick Scientific
	b) InnovaTM 43	New Brunswick Scientific
	c) TH25	Edmund Bühler
Kamera	EOS 450D Spiegelreflexkamera	Canon
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Mikroskope	a) IMT	Olympus
	b) Nikon Eclipse Ti (cLSM)	Nikon
pH-Elektrode	Toledo MP225 pH Meter	Mettler
PCR-Cycler	a) Thermocycler T-Gradient	Biometra
	b) Flex Cycler	Analytik Jena
Plattiergerät	a) Whitley Spiral Plater	Meintrap DWS
	b) Eddy Jet	IUL Instruments
Semidry-Elektroblotter	TE77	Pharmacia
Sterilbank	Herasafe	Heraeus
Tisch-Schüttler	a) WT12	Biometra
	b) S410	mLw
	c) Unimax 1010 (in Inkubator TH25)	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin

UV/VIS Spektrophotometer	a) NanoDrop® ND-1000	NanoDrop
	b) NanoPhotometer	Implen
	c) DU®720 Spectrophotometer	Beckman Coulter
UV-Transilluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Vortex Mixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	a) CP64	Sartorius AG
	b) 1212 MP	Sartorius AG
Zentrifugen	a) Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
	b) Labofuge400	Heraeus
	c) Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
	d) Avanti J-25	Beckman Coulter
	e) Vakuumzentrifuge	Labconco
	Rotoren: A-4-62; F-34-6-38; JA-10	

### 2.1.2 Spezielle Materialien

**Tabelle 2.2: Auflistung spezieller Materialien**

Materialbezeichnung	Name/Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller
96-deep well Platten	Zur Langzeitlagerung der Klonbank	278743	Thermo Scientific
Chromatographie Papier	17 CHR	3017915	Whatman
Cryo-Gef��e	Zur Lagerung von Glyzerolgefrierkulturen	E309.1	Roth
Deckgläschen	12 mm Deckgläschen	P.231.2	Roth
Dialyseschläuche	46 mm breit, MWCO 6.000	E.658.1	Roth
Dünnschichtplatten	Kieselgel 60 WF254s	1.16484	Merck
Elektroporationsküvetten	Küvetten für den CellPorator	11608-031	Whatman
Filter	a) Rotilabo®Spritzenfilter 13mm	T056.1	Roth
	b) FP30/0.3 CA-S-Sterilfilter	10462200	Schleicher & Schuell
Glasröhrchen	Gefäß zur Bakterienkultivierung	231721197	Schott
Kan��le	26-gauge Sterican Gr. 17	-	B. Braun
Küvetten	Einmal-Küvetten aus PMMA	P.95.1	Roth
Mikrotiterplatten	96-well, F-Form	3911925	Anicrin
Nickel Sepharose Säulchen	HisTrap HP 1 ml	17-5247-01	GE/ Amersham
Objektträger	a) Poly-L-Lysin Objektträger	L198.1	Roth
	b) Objektträger, geschliffen	ECN 631-1552	VWR
PVDF-Membran	Immobilon-P	IPVH00010	Millipore
Reaktionsgefäße	a) 1,5	0030.120.086/	Eppendorf
	2ml Safe-Lock Tubes	0030.120.094	Eppendorf
	b) PCR Tubes	683201	Greiner bio-one
	c) 15/ 50ml Tubes	188271/227270	Greiner bio-one
Serologische Pipetten	10/ 25ml, steril, BD Falcon	357530/356535	BD Bioscience
Spitzen	Einmal-Spitzen für Plattierger��t Eddy Jet	1780 (�� 4)	IUL Instruments
Spritze	Omnifix®-F ohne Kan��le	9161406V	B. Braun



Zellkulturflaschen	a) 25cm <sup>2</sup>	156367	Nunc
	b) 75cm <sup>2</sup>	178891	Nunc
	c) 175cm <sup>2</sup>	159910	Nunc
Zellkulturplatten	24-well Cellstar	662160	Greiner bio-one
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, improved	T729.1	Roth

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

Chemikalienbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	3029.2	Roth
Agar	101618	Merck
Agarose	V3125	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	0486	Amresco
Ampicillin Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau/Xylencyanol	B3269	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserum Albumin)	K41-001	PAA
Casein	C3400-500G	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	C-1919/C-0378	Sigma-Aldrich
Chloroform	102445	Merck
Coomassie, kolloidal (Roti®-Blue)	A152.1	Roth
DEPC-behandeltes Wasser	T143.3	Roth
Diethylether	100921	Merck
dNTP, Nukleotid Mix 10mM	BIO-39043	Bioline
Egg Yolk Emulsion (Eigelb für Eigelbagar)	SR0047C	Oxoid
Eisessig	100063	Merck
Ethanol, zur Analyse	100983	Merck
Ethidiumbromid	111608	Merck
Fötale Kalberserum (FKS)	A-15-043	PAA
D-(+)-Glukose	G7021	Sigma-Aldrich
Glyzerol 86%	7533.3	Roth
Glyzin	3908.2	Roth
Hefeextrakt	212720	BD Bioscience
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	BIO-37036	Bioline
Kaliumchlorid	104936	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104873	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	105104	Merck
Kaliumhydroxid Plätzchen	105033	Merck
Kanamycinmonosulfat	K-1377	Sigma-Aldrich
<i>Legionella</i> α Agarplatten (BCYE)	1860e	Heipha
<i>Legionella</i> Basis-Agar	110242	Merck

<i>Legionella</i> Wachstums-Supplement	SR 0110C	Oxoid
Lipoprotein defizientes fötales Kälberserum	S5394	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat	105833	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	105886	Merck
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich
METAFFECTENE® Pro	T040-2.0	Biontex
Methanol	T909.1	Roth
Mucosol	60434	Brand
Naphtol Blauschwarz	195243	Sigma-Aldrich
Natriumazetat-Trihydrat	106267	Merck
Natriumazid	106688	Merck
Natriumcarbonat	106392	Merck
Natriumchlorid	3957.2	Roth
Natriumcitrat	S-4641	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	D6750	Sigma-Aldrich
Natrium EDTA (Triplex III)	108418	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	106575	Merck
Natriumhypochlorid-Lösung	105614	Merck
Natriumthiosulfat	106512	Merck
Paraformaldehyd	8.187515.0100	Merck
PeqGOLD RNA Pure™	30-1020	peqLab
Pepton	LP0085	Oxoid
Petrolether	101769	Merck
Phenol	A156.2	Roth
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	79346	Sigma-Aldrich
Pro Long Gold Antifade Reagenz	P36930	Invitrogen
Pro Long Gold Antifade Reagenz mit DAPI	P36931	Invitrogen
2-Propanol, Isopropanol	6752.4	Roth
Protease Inhibitor Mix FY	39104.02	Serva
Roti-Liquid Barrier Marker	AN92.1	Roth
Roti-Nanoquant	K880.1	Roth
RPMI 1640	E15-840	PAA
Salzsäure, rauchend	100317	Merck
Saponin	4185.1	Roth
Skim Milk Powder	70166	Fluka
Sodium-Dodecylsulfat	CN30.2	Roth
Sorbitol	S3755	Sigma-Aldrich
Stärke	1.01252.0100	Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2367.3	Roth
Trichloressigsäure	8789.2	Roth
Tris Base	T8, 760-2	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	1.082.191.000	VWR
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%)	T8154	Sigma-Aldrich

Trypsin-EDTA	L11-004	PAA
Trypton	L47	Oxoid
Tween20	817072	Merck
X-gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	1161	Diagnostic Chemicals Ltd.
Ziegenserum	PCN5000	Invitrogen

### 2.1.4 Lipidsubstrate

**Tabelle 2.4:** Auflistung der verwendeten Lipidsubstrate

Bezeichnung	Abkürzung	Artikelnummer	Hersteller
Cardiolipin	-	840012P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	DPPC	850355P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-rac-1-Glyzerol	DPPG	840455P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	MPLPC	855675P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phospho-Glyzerol	MPLPG	858122P	Avanti Polar Lipids
1-Monopalmitoyl-rac-Glyzerol	1-MPG	M1640	Sigma-Aldrich
3 $\beta$ -Hydroxy-5-Cholesten (Cholesterol)	Chol	C-3045	Sigma-Aldrich
5-Cholesten-3-Palmitat (Cholesterolester)	CholE	C-78607	Sigma-Aldrich
Palmitinsäure	FFA	P-0500	Sigma-Aldrich

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2.5:** Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Bestandteile	Menge/ Konzentration
PBS Puffer (pH7,2)	KCl	0,2 g
zu 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
	NaCl	8 g
SET Puffer	NaCl	150 mM
	Tris-HCl	15 mM, pH7,4
	EDTA	1 mM
Tris Puffer (pH 7,5) für Lipidanalyse	Tris Base	40 mM
<b>Puffer für die DNA-Gelelektrophorese</b>		
50× TAE Puffer (pH 8,0)	Tris Base	2,0 M
	Eisessig	1,0 M
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 M
DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glyzerin	30 %
<b>Puffer für die Protein-Gelelektrophorese und Western Blot</b>		

SDS PAGE Probenpuffer	Tris Base (pH 6,8)	62,5 mM
	SDS	2 %
	Glyzerol	10 %
	$\beta$ -Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,001 %
SDS PAGE Laufpuffer (5 $\times$ )	Tris Base	25 mM
	Glyzin	384 mM
	SDS	0,2 %
Dehydratisierungslösung für Proteingele	EtOH	20 %
	Glyzerin (86 %)	10 %
Western Blot Transferpuffer	Tris Base	25 mM
	Glyzin	192 mM
	Methanol	10 %
Western Blot Waschpuffer (PBS-T)	1 $\times$ PBS Puffer	500 ml
	Tween 20	0,1%
<b>Puffer für die Proteinreinigung über His-Tag</b>		
Proteinbindepuffer (pH7,4)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	30 mM
Elutionspuffer (pH 7,4)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
<b>Fixierlösungen</b>		
3 % Paraformaldehydlösung (PFA)	Paraformaldehyd	1,5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 50 °C	40 ml
	NaOH	auf pH 7 einstellen
	10 $\times$ PBS	5 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad	50 ml
<b>SDS-Trenngel</b>		<b>SDS-Sammelgel</b>
	7,5 % 10 %	4 %
Acrylamid/ Bisacrylamid 30 %	2,5 ml 3,3 ml	530 $\mu$ l
1,5 M Tris Base (pH 8,8)	2,5 ml 2,5 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)
H <sub>2</sub> O	4,8 ml 4 ml	H <sub>2</sub> O
10 % SDS	100 $\mu$ l 100 $\mu$ l	10 % SDS
10 % APS	100 $\mu$ l 100 $\mu$ l	10 % APS
TEMED	10 $\mu$ l 10 $\mu$ l	TEMED
		4 $\mu$ l

### 2.1.6 Enzyme, Standards und Antikörper

**Tabelle 2.6: Auflistung verwendeter Enzyme, Standards und Antikörper** (mk: monoklonal, pk: polyklonal)

Enzymbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Antarctic Phosphatase (AP)	M0289	NEB
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich

PCR-Sequenzierungs-Polymerase (BigDye 3.1)	4337035	Applied Biosystems
Pfu DNA Polymerase	EP0501	Thermo Scientific
Phusion® High Fidelity DNA Polymerase F530-L	F530L	Thermo Scientific
Proteinase K	P-2308	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	-	NEB
Rnase OUT™ Ribonuklease (Rnase) Inhibitor	10777019	Invitrogen
T4 DNA Ligase	M0202	NEB
T4 Polynukleotidkinase	M0236 S	NEB
Taq DNA Polymerase	M0267	NEB
Turbo™ DNase	AM2238	Ambion
<b>Standards für Elektrophoresen</b>		
<b>Standard</b>	<b>Bereich</b>	<b>Artikelnummer Hersteller</b>
Gene Ruler DNA Laddermix	0,1-10 kb	SM0331 Thermo Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10-170 kDa	SM0671 Thermo Scientific
Page Ruler™ Unstained Protein Ladder	10-200 kDa	SM0661 Thermo Scientific
<b>Antikörper</b>		
<b>Spezifität/ Bezeichnung</b>	<b>Spender</b>	<b>Konjugat</b>
		<b>Artikel- nummer</b>
		<b>Hersteller</b>
		<b>eingesetzte Verdünnung (v/v)</b>
<b>Western Blot</b>		
anti-PatA Klon 85/5 (mk)	Maus	-
		-
		Diss. P. Auraß
		1:500
anti-Flag (mk)	Maus	-
		F3165
		Sigma-Aldrich
		1:2000
anti-GFP (mk)	Maus	-
		G6795
		Sigma-Aldrich
		1:3000
anti-His (mk)	Maus	-
		27-4710-01
		GE Healthcare
		1:3000
<b>Immunfluoreszenz- mikroskopie</b>		
anti- <i>Legionella</i> (pk)	Kaninchen	-
		BP2021
		Acris
		1:300
anti-Flag (mk)	Maus	-
		F3165
		Sigma-Aldrich
		1:500 bis 1:1000
anti-Kaninchen (pk)	Ziege	Alexa Fluor 594
		A11012
		Invitrogen
		1:500
anti-Maus (pk)	Ziege	Alexa Fluor 488
		A11001
		Invitrogen
		1:750 bis 1:1000

### 2.1.7 Analyse-Kits

**Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Analyse-Kits**

Produktbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
BigDye Terminator V 3.1 Ready Cycle Sequencing Kit	4337035	Applied Biosystems
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit	K160-01	Invitrogen
ECL Western blotting detection reagent	RPN2106	Amersham Bioscience
FireSilver Staining Kit	P-S-2001	Proteome Factory
Nefa HR Kit	434-91795	Wako Chemicals
OneStep RT-PCR Kit	210212	Qiagen
ProFound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit	21277	Thermo Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	28104	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	200519	Stratagene

## 2.1.8 Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen

### 2.1.8.1 Verwendete Plasmide

**Tabelle 2.8: Auflistung verwendeter Plasmide**

Plasmidbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
pBCKS+	212217	Stratagene
pEGFP-C2	6083-1	Clontech
pET160/GW/D-TOPO	K160-01	Invitrogen
pLAW344	-	(197)

**Tabelle 2.9: Auflistung verwendeter, in Vorarbeiten generierter Plasmide**

Plasmid-bezeichnung	Konstrukt	Insert [kb]	Resistenz	Referenz
pPA12	pET160 + <i>patA</i>	1,9	Amp	Dissertation P. Auraß
pPA46	pET160 + <i>patAS73A</i>	2,0	Amp	Dissertation P. Auraß
pPA54	pEGFP-C2 + <i>patA</i>	1,9	Kan	Dissertation P. Auraß
pPA55	pEGFP-C2 + <i>patAS73A</i>	1,9	Kan	P. Auraß (unveröffentlicht)
pPA56	pEGFP-C2 + <i>patAK492Stop</i>	1,5	Kan	Dissertation P. Auraß
pPA63	pET160 + <i>patAK492Stop</i>	1,5	Amp	Dissertation P. Auraß
pPA65	pEGFP-C2 + <i>patA</i> _AS 493-621	0,5	Kan	Dissertation P. Auraß
pPA99	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>mip</sub> <i>patA</i>	2,0	Cm	P. Auraß (unveröffentlicht)
pPA123	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>patA</sub> <i>patA</i>	2,0	Cm	P. Auraß (unveröffentlicht)

Das *patA*-Gen sämtlicher in Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10 verwendeter und erzeugter Plasmide wurde aus *L. pneumophila* Philadelphia-1 heraus amplifiziert.

**Tabelle 2.10: Auflistung erzeugter Plasmide**

Plasmid-bezeichnung	Konstrukt	Insert [kb]	Resistenz	Amplifizierungsprimer
pKS1	pBCKS + LPC3104	1,0	Cm	LPC_3104_SacI_fw/ LPC_3104_KpnI_rv
pKS2	pBCKS + lpg2303	1,2	Cm	lpg2303_XbaI_fw2/ lpg2303_PstI_rv2
pKS3	pBCKS + LPC0979	1,3	Cm	LPC_0979_XbaI_fw2/ LPC_0979_PstI_rv2
pKS4	pLAW344 + LPC0979	1,3	Cm	LPC_0979_XbaI_fw2/ LPC_0979_PstI_rv2
pKS5	pEGFP-C2 + <i>patAC499A</i>	1,9	Kan	lpg2831_A499_fw/ lpg2831_A499_rv
pKS6	pEGFP-C2 + <i>patAK510A</i>	1,9	Kan	lpg2831_Ala510f/ lpg2831_Ala510r
pKS7	pEGFP-C2 + <i>patAC499A/K510A</i>	1,9	Kan	lpg2831_Ala510f/ lpg2831_Ala510r
pKS8	pEGFP-C2 + <i>patAK510Stop</i>	1,5	Kan	patAK510Stop_fw/ patAK510Stop_rv
pKS9	pEGFP-C2 + <i>patAK566Stop</i>	1,7	Kan	patAK566Stop_fw/ patAK566Stop_rv
pKS10	pEGFP-C2 + <i>patAR611Stop</i>	1,8	Kan	patAR611Stop_fw/ patAR611Stop_rv
pKS11	pEGFP-C2 + <i>patAS615A</i>	1,9	Kan	lpg2831_S615A_fw/ lpg2831_S615A_rv
pKS12	pEGFP-C2 + <i>patAS615A/T616A/T617A</i>	1,9	Kan	lpg2831_STT_A_fw/ lpg2831_STT_A_rv

pKS13	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAC499A</i>	1,9	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS14	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAK510A</i>	1,9	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS15	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAC499A/K510A</i>	1,9	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS16	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAK510Stop</i>	1,5	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS17	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAK566Stop</i>	1,7	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS18	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAR611Stop</i>	1,8	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS19	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAS615A</i>	1,9	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS20	pET160/GW/D-TOPO + <i>patAS615A/T616A/T617A</i>	1,9	Amp	pET160_ <i>patA_fw</i> / pET160_ <i>patA_rv</i>
pKS21	pEGFP-C2 + <i>patAK609A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K609A_fw</i> / <i>patA_K609A_rv</i>
pKS22	pEGFP-C2 + <i>patAK590A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K590A_fw</i> / <i>patA_K590A_rv</i>
pKS23	pEGFP-C2 + <i>patAK580A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K580A_fw</i> / <i>patA_K580A_rv</i>
pKS24	pEGFP-C2 + <i>patAK566A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K566A_fw</i> / <i>patA_K566A_rv</i>
pKS25	pEGFP-C2 + <i>patAK557A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K557A_fw</i> / <i>patA_K557A_rv</i>
pKS26	pEGFP-C2 + <i>patAK550A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K550A_fw</i> / <i>patA_K550A_rv</i>
pKS27	pEGFP-C2 + <i>patAK533A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K533A_fw</i> / <i>patA_K533A_rv</i>
pKS28	pEGFP-C2 + <i>patAK523A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K523A_fw</i> / <i>patA_K523A_rv</i>
pKS29	pEGFP-C2 + <i>patAK501A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K501A_fw</i> / <i>patA_K501A_rv</i>
pKS30	pEGFP-C2 + <i>patAK494A</i>	1,9	Kan	<i>patA_K494A_fw</i> / <i>patA_K494A_rv</i>
pKS31	pEGFP-C2 + <i>patADelE519_E527</i>	1,8	Kan	<i>patA_Del519-527fw</i> / <i>patA_Del519-527rv</i>
pKS32	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K492Stop</i>	1,5	Kan	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS33	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K510Stop</i>	1,5	Kan	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS34	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K566Stop</i>	1,7	Kan	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS35	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/R611Stop</i>	1,8	Kan	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS36	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/DelE519_E527</i>	1,8	Kan	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS37	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/DelK533_D555</i>	1,8	Kan	<i>patA_Del533-555fw</i> / <i>patA_Del533-555rv</i>
pKS38	pBCKS + 3 × Flag_ <i>P<sub>mip</sub></i> - <i>patA_S73A</i>	2,0	Cm	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>
pKS39	pBCKS + 3 × Flag_ <i>P<sub>patA</sub></i> - <i>patA_S73A</i>	2,0	Cm	<i>patA_S73A_sens</i> / <i>patA_S73A_as</i>

### 2.1.8.2 Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 2.11: Auflistung verwendeter Oligonukleotide** Abkürzungen: Inv PCR, Inverse Polymerasekettenreaktion; S, Sequenzierung; Tn5 V, Transposon Tn5-Insertionsort Verifizierung; K, Klonierung; Kol PCR, Kolonie- Polymerasekettenreaktion; RT-PCR, Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion; M, Mutagenese

Primer	Primer Nr.	Schmelz-temp.	Sequenz	Anwendung
KAN-2FP-1	72	57 °C	ACCTACAACAAAgCTCTCATCAACC	Inv PCR/ S
KAN-2RP-1	73	53 °C	gCAATgTAACATCAGAgATTTTgAg	Inv PCR/ S

Inv-1 EZTN	378	56 °C	ATggCTCATAACACCCCTTgTATTA	Inv PCR/ S
Inv-2 EZTN	379	56 °C	gAACTTTTgCTgAgTTgAAggATCA	Inv PCR/ S
proA_a1_f	261	69 °C	CCgCggCTgggCACTCCAggAAgAgT	Tn5 V
proA_b1_r	262	57 °C	gAgCTCTTCTggCTgAATTTTATCAATCAA	Tn5 V
RTgyr_a1f	285	56 °C	CACATATggCCggCTTTAgAg	RT-PCR
RTgyr_b1r	286	57 °C	TCgCgCTTgTTTTgCTgAg	RT-PCR
LPC_3104_SacI_fw	1204	62 °C	TGAGCTCGTTATGGAACTACTATTCC	K
LPC_3104_KpnI_rv	1205	62 °C	TTGGTACCTTATTTGCGAAATAGCAGAG	K
lpg2303_XbaI_fw2	1206	63 °C	ATCTAGACGAGTAAGGCATGTCAGG	K
lpg2303_PstI_rv2	1207	66 °C	TATCTGCAGGTACAGTTCCTGCTTGCG	K
pBC_a1_f	212	52 °C	ggTTTTCCCAgTCACgA	S
pBC_b1_r	213	54 °C	CgCgCAATTAACCCTCAC	S
LPC_0979_XbaI_fw2	1208	57 °C	ATCTAGAGGTGATAATTTGATTGATAG	K
LPC_0979_PstI_rv2	1209	64 °C	ATACTGCAGGTTTTGATTGACTGTTGGG	K
LPC_0978_int_fw	1200	55 °C	TTGCTCATAATTCTTGCTGTA	RT-PCR
LPC_0978_int_rv	1201	52 °C	GACTCGTTAATTCTCACCA	RT-PCR
LPC_0979_int_fw	1202	55 °C	ACTCATTACTTTTACGCTGTCA	RT-PCR
LPC_0979_int_rv	1203	52 °C	AAACAGTCATTCTTCAACCAA	RT-PCR
LPC_3104_int_fw	1212	53 °C	AAGCAGCATTAATTTGAAGGAA	RT-PCR
LPC_3104_int_rv	1213	58 °C	CATGATAAAGACGATAGAGTAGTG	RT-PCR
LPC_0979_RT_fw	1214	61 °C	CTGTCCCCTATGCTGCTTTTATCA	RT-PCR
LPC_0979_RT_rv	1215	58 °C	CATTATCCTTGGCTGTCACC	RT-PCR
Pmip_fw	1148	53 °C	TAGTGGGCGATTTGTTTTTG	S
LPC_0088_fw	1995	49 °C	CCATTTCTAATCATATTGAC	Tn5 V
LPC_0088_rv	1996	49 °C	GACTCTTCAAAAGATAGG	Tn5 V
LPC_3266_fw	1997	57 °C	CACCATGACAAAGGACTACC	Tn5 V
LPC_3266_rv	1998	54 °C	GATGAAATAGCAACAGGATAG	Tn5 V
lpg0645_fw	1999	57 °C	GGATTGGAGGGTAATGACAC	Tn5 V
lpg0645_rv	2000	54 °C	CACCAATGTAATGAGTTCATC	Tn5 V
lpg0288_fw	2001	55 °C	CGCACAGTTTATCAAGTCTG	Tn5 V
lpg_0288_rv	2002	52 °C	GACAGAACATATCAAGCTC	Tn5 V
lpg2501_fw	2003	51 °C	CAATCGCATAATTTTTGGTG	Tn5 V
lpg2501_rv	2004	54 °C	GGGGAAGTTAACAGACTG	Tn5 V
LPC_0950_fw	2005	59 °C	CCCGCTATTGAAACACGAGG	Tn5 V
LPC_0950_rv	2006	60 °C	CAGATTGAGCGTGGGTGTTAG	Tn5 V
pLAW_MCSseq_fw	2007	55 °C	CGGCAGGTATATGTGATGGG	S
pLAW_MCSseq_rv	2008	59 °C	AACAGGGAAGTGAGAGGGCC	S
patA_S73A_sens	737	71 °C	CTGACCCATGTTAGCGGAGCAGCTGCCGGG	M
patA_S73A_as	738	71 °C	GCAATGAC	M
			GTCATTGCTCCGGCAGCTGCTCCGC	M
			TAACATGGGTCAG	M
pET160_patA_fw	2009	58 °C	CACCTTGAACTTGCTGAAATTATG	K
pET160_patA_rv	2010	45 °C	TTAATGGCCGCCAAA	K
pEGFPC1for	1076	55 °C	GATCACTCTCGGCATGGAC	S
pEGFPC1rev	1077	52 °C	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGG	S
Lpg2831_A499_fw	2011	61 °C	CCTTTGCCCTCGCTATTAACAAGT	M
Lpg2831_A499_rv	2012	61 °C	ACTTGTTTAATAGCGAGGGCAAAGG	M
Lpg2831_Ala510f	2013	60 °C	TAAGTGAAGGAGCTCTGGAACTTA	M
Lpg2831_Ala510r	2014	60 °C	TAAGTTTCCAGAGCTCCTTCACTTA	M
patAK510Stop_fw	2015	56 °C	TAAGTGAAGGAAAATAAGAACTTACTT	M
patAK510Stop_rv	2016	56 °C	AAGTAAGTTTCTTATTTTCCTTCACTTA	M
patAK566Stop_fw	2017	65 °C	CCTGAACCGGTTAAGTAATCTACCTCTG	M
patAK566Stop_rv	2018	65 °C	CAGAGGTAGATTACTTAACCGGTTTCAGG	M
patAR611Stop_fw	2019	61 °C	GCAAGAAAAAGAAAGGTAAGGTCTTTCA	M
patAR611Stop_rv	2020	61 °C	TGAAAGACCTTACCTTTCTTTTCTTGC	M



Lpg2831_S615A_fw	2021	70 °C	GTTGGTCTTGCTACCACATTTGGCGGCC	M
Lpg2831_S615A_rv	2022	70 °C	GGCCGCCAAATGTGGTAGCAAGACCAAC	M
Lpg2831_STT_A_fw	2023	72 °C	GTTGGTCTTGCTGCTGCCTTTGGCGGCC	M
Lpg2831_STT_A_rv	2024	72 °C	GGCCGCCAAAGGCAGCAGCAAGACCAAC	M
PatA_K609A_fw	2025	66 °C	CCCTGCAAGAAGCTGAAAGGGTTGG	M
PatA_K609A_rv	2026	66 °C	CCAACCCTTTTCAGCTTCTTGCAGGG	M
PatA_K590A_fw	2027	62 °C	CGTAGAGTATAGAGCTATCATAGCTG	M
PatA_K590A_rv	2028	62 °C	CAGCTATGATAGCTCTATACTCTACG	M
PatA_K580A_fw	2029	58 °C	CTCTAATCAAGCTGATATCAATCC	M
PatA_K580A_rv	2030	58 °C	GGATTGATATCAGCTTGATTAGAG	M
PatA_K566A_fw	2031	66 °C	CCTGAACCGGTTGCTGTTTCTACCTC	M
PatA_K566A_rv	2032	66 °C	GAGGTAGAAACAGCAACCGGTTTCAGG	M
PatA_K557A_fw	2033	63 °C	GCCCAAGACTTTGCTGTTGAAGTTC	M
PatA_K557A_rv	2034	63 °C	GAACCTCAACAGCAAAGTCTTGGGC	M
PatA_K550A_fw	2035	71 °C	GTTTCCCTGTTTCGCTGGCCCTGCCC	M
PatA_K550A_rv	2036	71 °C	GGGCAGGGCCAGCGAACAGGGAAAC	M
PatA_K533A_fw	2037	63 °C	GCTGGGCCACAGCTATATTGAATC	M
PatA_K533A_rv	2038	63 °C	GATTCAATATAGCTGTGGCCCAGC	M
PatA_K523A_fw	2039	73 °C	GGCAGAAGCTGCTGCAGCCGCTGAGC	M
PatA_K523A_rv	2040	73 °C	GCTCAGCGGCTGCAGCAGCTTCTGCC	M
PatA_K501A_fw	2041	61 °C	GCCCTCTGCATTGCTCAAGTTAATT	M
PatA_K501A_rv	2042	61 °C	AATTAACCTTGAGCAATGCAGAGGGC	M
PatA_K494A_fw	2043	68 °C	CATCCAGAAAGAGGCTGCCTTTGCCC	M
PatA_K494A_rv	2044	68 °C	GGGCAAAGGCAGCCTCTTTCTGGATG	M
PatA_Del519-527fw	2045	58 °C	CCTAGCTGGGCCACAAAG	M
PatA_Del519-527rv	2046	51 °C	AACTTTATTCAAGTAAGTTTCC	M
PatA_Del519-527	2047	70 °C	GAGGCAGAAGCTAAAGCAGCCGCTGAG	Kol PCR
PatA_Del533-555fw	2048	53 °C	TTTAAAGTTGAAGTTCAACCTGAA	M
PatA_Del533-555rv	2049	64 °C	TGTGGCCCAGCTAGGCTCAGC	M
PatA_Del533-555	2050	58 °C	CCAATTGAATGGGTTGTTTCCC	Kol PCR

### 2.1.8.3 Verwendete Bakterien und Zellen

**Tabelle 2.12: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinien**

Bakterienstamm/Zelllinie	Katalog-Nr.	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> BL21	C161003	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5α	18258-012	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Top10	C664-55	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	200249	Stratagene
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 Corby	-	(198)
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 JR32	-	(199)
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	ATCC
A549 Epithelzellen	CCL-185	ATCC
U937 Makrophagen	CRL-1593.2	ATCC

## 2.1.9 Erzeugte und verwendete gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tabelle 2.13: Auflistung erzeugter und verwendeter gentechnisch veränderter Organismen (GVO)

Bezeichnung GVO	Klon Nr.	Konstrukt	Bemerkung
<i>E. coli</i>			
DH5 $\alpha$ (pKS1)	4	pBCKS + LPC3104	Klonierung zur Komplementation von LPC3104 in <i>Legionella</i> Tn5-Mutante
DH5 $\alpha$ (pKS2)	6	pBCKS + lpg2303	Klonierung zur Komplementation von lpg2303 in <i>Legionella</i> Tn5-Mutante
DH5 $\alpha$ (pKS3)	3	pBCKS + LPC0979	Klonierung zur Komplementation von LPC0979 in <i>Legionella</i> Tn5-Mutante
DH5 $\alpha$ (pKS4)	1	pLAW344 + LPC0979	Klonierung zur Komplementation von LPC0979 in <i>Legionella</i> Tn5-Mutante (Genomreintegration)
DH5 $\alpha$ (pEGFP-C2)	1	pEGFP-C2	Überexpression des GFP-Kontrollvektors für Transfektion
DH5 $\alpha$ (pPA54)	1	pEGFP-C2 + <i>patA</i>	Überexpression von GFP-PatA für Transfektion
DH5 $\alpha$ (pPA55)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS73A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante S73A
DH5 $\alpha$ (pPA56)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK492Stop</i>	Überexpression verkürzter GFP-PatA-Version; AS 1-492
DH5 $\alpha$ (pPA65)	7	pEGFP-C2 + <i>patA</i> nur C-Terminus	Überexpression GFP-PatA-C-Terminus; AS 493-621
XL1-Blue (pKS5)	1	pEGFP-C2 + <i>patAC499A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante C499A
XL1-Blue (pKS6)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK510A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K510A
XL1-Blue (pKS7)	1	pEGFP-C2 + <i>patAC499A/K510A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante C499A/K510A
XL1-Blue (pKS8)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK510Stop</i>	Überexpression verkürzter GFP-PatA-Version; AS 1-510
XL1-Blue (pKS9)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK566Stop</i>	Überexpression verkürzter GFP-PatA-Version; AS 1-566
XL1-Blue (pKS10)	1	pEGFP-C2 + <i>patAR611Stop</i>	Überexpression verkürzter GFP-PatA-Version; AS 1-611
XL1-Blue (pKS11)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS615A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante S615A
XL1-Blue (pKS12)	4	pEGFP-C2 + <i>patAS615A/T616A/T617A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante S615A/T616A/T617A
Top10 (pKS13)	8	pET160 + <i>patAC499A</i>	Klonierung zur Überexpression "site-directed" PatA-Mutante C499A
BL21 (pKS13)	1	pET160 + <i>patAC499A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante C499A
Top10 (pKS14)	3	pET160 + <i>patAK510A</i>	Klonierung zur Überexpression "site-directed" PatA-Mutante K510A
BL21 (pKS14)	1	pET160 + <i>patAK510A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante K510A
Top10 (pKS15)	1	pET160 + <i>patAC499A/K510A</i>	Klonierung zur Überexpression "site-directed" PatA-Mutante C499A/K510A
BL21 (pKS15)	1	pET160 + <i>patAC499A/K510A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante C499A/K510A
Top10 (pKS16)	11	pET160 + <i>patAK510Stop</i>	Klonierung zur Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-510
BL21 (pKS16)	1	pET160 + <i>patAK510Stop</i>	Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-510
Top10 (pKS17)	1	pET160 + <i>patAK566Stop</i>	Klonierung zur Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-566

BL21 (pKS17)	1	pET160 + <i>patAK566Stop</i>	Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-566
Top10 (pKS18)	3	pET160 + <i>patAR611Stop</i>	Klonierung zur Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-611
BL21 (pKS18)	1	pET160 + <i>patAR611Stop</i>	Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-611
Top10 (pKS19)	5	pET160 + <i>patAS615A</i>	Klonierung zur Überexpression "site-directed" PatA-Mutante S615A
BL21 (pKS19)	1	pET160 + <i>patAS615A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante S615A
Top10 (pKS20)	1	pET160 + <i>patAS615A/T616A/T617A</i>	Klonierung zur Überexpression "site-directed" PatA-Mutante S615A/T616A/T617A
BL21 (pKS20)	1	pET160 + <i>patAS615A/T616A/T617A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante S615A/T616A/T617A
XL1-Blue (pKS21)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK609A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K609A
XL1-Blue (pKS22)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK590A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K590A
XL1-Blue (pKS23)	5	pEGFP-C2 + <i>patAK580A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K580A
XL1-Blue (pKS24)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK566A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K566A
XL1-Blue (pKS25)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK557A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K557A
XL1-Blue (pKS26)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK550A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K550A
XL1-Blue (pKS27)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK533A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K533A
XL1-Blue (pKS28)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK523A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K523A
XL1-Blue (pKS29)	1	pEGFP-C2 + <i>patAK501A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K501A
XL1-Blue (pKS30)	2	pEGFP-C2 + <i>patAK494A</i>	Überexpression "site-directed" GFP-PatA-Mutante K494A
XL1-Blue (pKS31)	1	pEGFP-C2 + <i>patADelE519_E527</i>	Überexpression GFP-PatA-Deletionsmutante; AS 519-527 fehlen
XL1-Blue (pKS32)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K492Stop</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der verkürzten GFP-PatA-Version; AS 1-492
XL1-Blue (pKS33)	2	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K510Stop</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der verkürzten GFP-PatA-Version; AS 1-510
XL1-Blue (pKS34)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/K566Stop</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der verkürzten GFP-PatA-Version; AS 1-566
XL1-Blue (pKS35)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/R611Stop</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der verkürzten GFP-PatA-Version; AS 1-611
XL1-Blue (pKS36)	1	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/DelE519_E527</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der GFP-PatA-Deletionsmutante; AS 519-527 fehlen
XL1-Blue (pKS37)	4	pEGFP-C2 + <i>patAS73A/DelK533_D555</i>	Überexpression "site-directed" Mutante S73A der GFP-PatA-Deletionsmutante; AS 533-555 fehlen
XL1-Blue (pKS38)	1	pBCKS + 3 × Flag_ <i>P<sub>mip</sub></i> _patA_S73A	Überexpression "site-directed" Mutante S73A von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag
XL1-Blue (pKS39)	3	pBCKS + 3 × Flag_ <i>patA</i> _S73A (nativer Promotor)	Expression "site-directed" Mutante S73A von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag
BL21 (pPA12)	1	pET160 + <i>patA</i>	Überexpression von PatA
BL21 (pPA46)	1	pET160 + <i>patAS73A</i>	Überexpression "site-directed" PatA-Mutante S73A
BL21 (pPA63)	1	pET160 + <i>patAK492Stop</i>	Überexpression verkürzter PatA-Version; AS 1-492

<b><i>L. pneumophila</i></b>			
<b>JR32</b>			
Wildtyp (pBCKS)	1	pBCKS	Kontrollstamm
Wildtyp (pKS2)	1	pBCKS + lpg2303	Expression des Komplementationsvektors im Wildtypstamm
<i>aroC</i> ::Tn5 (pKS2)	1	pBCKS + lpg2303	Expression des Komplementationsvektors in der Transposonmutante
Wildtyp (pPA99)	1	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>mip</sub> _patA	Überexpression von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag
<i>dotB</i> ::Kn <sup>R</sup> (pPA99)	4	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>mip</sub> _patA	Überexpression von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag in <i>dotB</i> -Mutante
Wildtyp (pPA123)	3	pBCKS + 3 × Flag_patA (nativer Promotor)	Expression von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag
<i>dotB</i> ::Kn <sup>R</sup> (pPA123)	5	pBCKS + 3 × Flag_patA (nativer Promotor)	Expression von PatA mit N-terminalem 3× Flag-tag in <i>dotB</i> -Mutante
Wildtyp (pKS38)	2	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>mip</sub> _patA_S73A	Überexpression von "site-directed" PatA-Mutante S73A mit N-terminalem 3× Flag-tag
<i>dotB</i> ::Kn <sup>R</sup> (pKS38)	1	pBCKS + 3 × Flag_P <sub>mip</sub> _patA_S73A	Überexpression von "site-directed" PatA-Mutante S73A mit N-terminalem 3× Flag-tag in <i>dotB</i> -Mutante
Wildtyp (pKS39)	1	pBCKS + 3 × Flag_patA_S73A (nativer Promotor)	Expression von "site-directed" PatA-Mutante S73A mit N-terminalem 3× Flag-tag
<i>dotB</i> ::Kn <sup>R</sup> (pKS39)	2	pBCKS + 3 × Flag_patA_S73A (nativer Promotor)	Expression von "site-directed" PatA-Mutante S73A mit N-terminalem 3× Flag-tag in <i>dotB</i> -Mutante
<b><i>L. pneumophila</i></b>			
<b>Corby</b>			
Wildtyp (pBCKS)	1	pBCKS	Kontrollstamm
Wildtyp (pKS1)	1	pBCKS + LPC3104	Expression des Komplementationsvektors im Wildtypstamm
<i>yrfl</i> ::Tn5 (pKS1)	1	pBCKS + LPC3104	Expression des Komplementationsvektors in der Transposonmutante
Wildtyp (pKS3)	15	pBCKS + LPC0979	Expression des Komplementationsvektors im Wildtypstamm
<i>pabB</i> ::Tn5 (pKS3)	5	pBCKS + LPC0979	Expression des Komplementationsvektors in der Transposonmutante
<i>pabB</i> ::Tn5 (pKS4)	1	pLAW344 + LPC0979	Komplementation der Transposonmutante durch Genomreintegration von LPC0979

**Tabelle 2.14:** Auflistung der aus der Transposon (Tn5)-Klonbank isolierten Transposoninsertionsmutanten

Name der Mutante	Bezeichnung GVO	Bemerkung
<b><i>L. pneumophila</i> JR32</b>		
IV G11	JR32 lpg1381::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XX C7	JR32 lpg1529::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXIII F2	JR32 lpg1366::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXIII A5	JR32 lpg2303::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXIII B6	JR32 lpg0645::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXIV G11	JR32 lpg0288::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXVI G5	JR32 lpg2885::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXVI H6	JR32 lpg0105::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXVII H4	JR32 lpg1200::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXVII C5	JR32 lpg2501::Tn5	Siehe Tabelle 3.3
XXVII F12	JR32 lpg0281::Tn5	Siehe Tabelle 3.3

<b><i>L. pneumophila</i> Corby</b>		
I F6	Corby lpc0979::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
II B2	Corby lpc2877::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
X C9	Corby lpc1957::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVI G1	Corby lpc1457::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVII E5	Corby lpc1023::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVII G5	Corby lpc1670::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVIII C5	Corby lpc2057::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVIII A9	Corby lpc0088::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XVIII F12	Corby lpc3104::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XIX F12	Corby lpc2095::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XIX H12	Corby lpc0310::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XXI G7	Corby lpc0337::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XXI H10	Corby lpc1174::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XXIII A9	Corby lpc0069::Tn5	Siehe Tabelle 3.2
XXIII H10	Corby lpc3266::Tn5	Siehe Tabelle 3.2

### 2.1.10 Kulturmedien für Bakterien und Zellen

**Tabelle 2.15:** Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *L. pneumophila*

BYE-Flüssigmedium (BYE Buffered Yeast Extract)		BCYE-Agar-Platten (BCYE Buffered Charcoal Yeast Extract)	
<p>10 g Hefeextrakt</p> <p><b>14,45 g <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement:</b></p> <p>10 g ACES Puffer</p> <p>2,8 g KOH</p> <p>1,0 g <math>\alpha</math>-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz</p> <p>0,4 g L-Cystein HCl</p> <p>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zu 1000 ml</p>		<p><b>27,5 g <i>Legionella</i> Basis-Agar:</b></p> <p>10 g Hefeextrakt</p> <p>1,5 g Aktivkohle</p> <p>16 g Agar</p> <p><b>14,45 g <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement</b></p> <p>10 g ACES Puffer</p> <p>2,8 g KOH</p> <p>1,0 g <math>\alpha</math>-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz</p> <p>0,4 g L-Cystein HCl</p> <p>H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zu 1000 ml</p>	
<p>Das <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement wurde mit Hefeextrakt in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und steril filtriert.</p>		<p>Der <i>Legionella</i> Basis-Agar wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> suspendiert und autoklaviert. Das <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben.</p>	
Legionella "Screening"-Medien			
Humanblut-Agar		Casein-Agar	
<p>10 g Hefeextrakt</p> <p>16 g Agar</p> <p>1,5 g Stärke</p> <p>850 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></p>		<p>10 g Hefeextrakt</p> <p>16 g Agar</p> <p>1,5 g Stärke</p> <p>10 g Casein</p> <p>900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub></p>	
<p>Nach dem Autoklavieren:</p> <p>100 ml <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement</p>		<p>Nach dem Autoklavieren:</p> <p>100 ml <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement</p>	

50 ml humanes Erythrozytenkonzentrat
<b>Eigelb-Agar</b>
10 g Hefeextrakt
16 g Agar
1,5 g Stärke
870 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Nach dem Autoklavieren:
100 ml <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement
200 ml Eigelb

Das zur Anzucht von *L. pneumophila* verwendete Labormedium BCYE (200) wurde sowohl kommerziell erworben als auch selbst hergestellt. BCYE-Platten mit Antibiotikazusatz wurden generell selbst hergestellt.

**Tabelle 2.16: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *E. coli***

<b>Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium</b>	<b>Luria-Bertani (LB)-Agar-Platten</b>
10 g Trypton	10 g Trypton
5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt
5 g NaCl	5 g NaCl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> zu 1000 ml	15 g Agar
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> zu 1000 ml
Die Bestandteile der beiden Medien wurden zunächst in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> gelöst und anschließend autoklaviert.	
<b>SOB-Medium (pH 7,0) (Super Optimal Broth Medium)</b>	<b>SOC-Medium (Super Optimal Broth-Derivat)</b>
20 g Trypton	98 ml SOB-Medium
5 g Hefeextrakt	1 ml 2M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung (20,33 g MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O und
0,584 g NaCl	24,65 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O je 100 ml Stammlösung)
0,186 g KCl	1 ml 2M Glukose-Stammlösung (36,04 g Glukose je
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> zu 1000 ml	100 ml Stammlösung)
Die Bestandteile wurden zunächst in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> gelöst und anschließend autoklaviert.	Vor der Zugabe der Lösungen zum SOB-Medium wurde die Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung autoklaviert und die Glukose-Stammlösung steril filtriert.

**Tabelle 2.17: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *A. castellanii* und zur Infektion der Amöben mit *L. pneumophila***

<b>PYG-Kulturmedium (Peptone Yeast Extract Glucose)</b>	<b>Infektionsmedium</b>
20 g Pepton	Bestandteile wie PYG-Kulturmedium jedoch ohne Pepton,
1 g Hefeextrakt	Hefeextrakt und Glukose
10 ml 400mM MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	
10 ml 400mM CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	
10 ml 250mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	

10 ml 250mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
10 ml 5mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	
2,5 g NaCitrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$	
50 ml 2M Glukose	
900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	Bis auf die Glukose wurden alle Bestandteile in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die steril filtrierte Glukoselösung dazu gegeben.

**Tabelle 2.18:** Auflistung des Nährmediums zur Kultivierung und Infektion von U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen

RPMI Kultur- und Infektionsmedium mit 10 % FKS (Roswell Park Memorial Institute Medium)
RPMI 1640 Flüssigmedium
10 % hitzeinaktiviertes FKS
Das fötale Kälberserum wurde für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert.

**Tabelle 2.19:** Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration für <i>L. pneumophila</i> [µg/ml]	Endkonzentration für <i>E. coli</i> [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	100 g/l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	resistent	100
Chloramphenicol (Cm)	30 g/l EtOH	6	30
Kanamycinmonosulfat (Km)	50 g/l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	25	50
Die Stammlösungen wurden steril filtriert, Aliquots bei -20 °C gelagert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.			

### 2.1.11 Verwendete Software

**Tabelle 2.20:** Verwendete Software und Internet-Datenbanken

Datenbank	Adresse
Biocyc	<a href="http://www.biocyc.org">http://www.biocyc.org</a>
BPROM	<a href="http://linux1.softberry.com/berry.phtml">http://linux1.softberry.com/berry.phtml</a>
Kyte-Doolittle Hydropathy plot	<a href="http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2">http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Oligo Analyzer 3.1	<a href="http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/">http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/</a>
Peptide Cutter	<a href="http://web.expasy.org/peptide_cutter/">http://web.expasy.org/peptide_cutter/</a>
ProtCompB	<a href="http://linux1.softberry.com/berry.phtml">http://linux1.softberry.com/berry.phtml</a>
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
Sequenz-Alignment	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
SignalP 3.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP</a>
SMART	<a href="http://www.smart.embl-heidelberg.de">http://www.smart.embl-heidelberg.de</a>
SOSUI	<a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/">http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/</a>
Programme	Hersteller
Acolyte (Koloniezählprogramm)	Synbiosis
Bio 1D	Vilber Lourmat
Lasergene 8	DNASTAR, Inc.

Magellan V5.03	Tecan
NIS-Elements AR 3.2	Nikon
Quantity One	Bio-Rad

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Bakterien

#### 2.2.1.1 *Legionella pneumophila*

Aus einer bei -80 °C gelagerten Glyzerinkryokultur wurden die Legionellen-Stämme mittels einer sterilen Impföse auf BCYE $\alpha$ -Agar bzw. BCYE $\alpha$ -Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 2 Tage bei 37 °C bebrütet (Mutterplatten). Diese Mutterplatten wurden im Kühlschrank bis zu einem Monat gelagert. Für die Arbeit mit Legionellen-Stämmen die ein Plasmid tragen, erfolgte das Anlegen von Tochterplatten durch Ausstreichen auf BCYE $\alpha$ -Agar mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen (s. Tabelle 2.19). Wildtypstämme wurden auf BCYE $\alpha$ -Agar angelegt. Die Tochterplatten wurden für 1-3 d bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgte durch Entnahme von Bakterienmaterial mit einem sterilen Wattetupfer von den Tochterplatten. Zur Anzucht einer Vorkultur wurden mit Bakterienmaterial dieser Tochterplatten, Röhrchen mit BYE-Nährbouillon mit/ohne Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Nach photometrischer Bestimmung der optischen Dichte bei 660 nm wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>660</sub> von 0,3-0,4 eingestellt und unter Schütteln i. d. R. bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>660</sub> ~2,0) kultiviert.

#### 2.2.1.2 *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden zunächst LB-Agarplatten (bei plasmidhaltigen Stämmen mit entsprechendem Antibiotikum) mit Bakterienmaterial aus Glyzerinkryokulturen beimpft und für 18-24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Diese Platten wurden bis zu einem Monat im Kühlschrank bei ca. 4 °C gelagert und bei Bedarf zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Dabei wurde etwas Bakterienmaterial mit einer sterilen Impföse entnommen und in LB-Bouillon entsprechend mit oder ohne Antibiotika suspendiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm über Nacht inkubiert.



### 2.2.1.3 Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen

Für die Langzeitlagerung wurden *L. pneumophila* und *E. coli* Stämme für 1-2 d auf den zugehörigen Selektivagarplatten angezogen (s. 2.2.1.1). Im Anschluss daran wurde mittels einer Impföse Bakterienmaterial entnommen und in der entsprechenden Nährbouillon ohne Antibiotika in Kryoröhrchen suspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit sterilem Glyzerol in einem Volumenverhältnis von 1:1 vermischt und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2 Anzucht von Makrophagen, Epithel- und *Acanthamoeba*-Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Kulturmedium (RPMI bzw. PYG) + 10 % DMSO eingefrorenen Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank aufgetaut und 2 min bei  $1.000 \times g$  zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und erneut bei  $1.000 \times g$  für 10 min pelletiert. Nach einem erneuten Resuspensionsschritt in 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen in ein Kulturgefäß überführt. Nach 3 (*A. castellanii*) bzw. 10 (U937, A549) Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen erstmalig passagiert und anschließend in Intervallen von 3 bis 4 Tagen regelmäßig passagiert (maximal 30-mal), wobei ein Verhältnis von 1:10 bis 1:12 (v/v) der Zellen zum Wachstumsmedium bei den jeweiligen Inkubationslängen berücksichtigt wurde.

## 2.2.3 Grundlegende Nukleinsäure-Techniken

### 2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA von *Legionella*

Von einer 2-tägig bei 37 °C bebrüteten BCYE-Agarplatte mit *L. pneumophila* wurde mittels eines sterilen Wattetupfers Koloniematerial entnommen und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einem 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei  $5000 \times g$  erfolgte zunächst eine Aufnahme des Pellet in 0,5 ml SET-Puffer, danach die Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml) und 5 µl RNase (100 mg/ml) und ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C im Thermomixer. Dem Lysat wurden anschließend 60 µl 10 % SDS und 3 µl Proteinase K (18,6 mg/ml) zugegeben und die Proben wurden durch vorsichtiges Umdrehen homogenisiert und unter gelegentlichem Wenden für 2 Stunden bei 55 °C im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 210 µl 6 M NaCl und 850 µl Chloroform, sowie ein weiterer Inkubationsschritt von 60 min bei Raumtemperatur unter Rotation (Rotator). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei  $6000 \times g$  wurde die wässrige Phase abpipettiert und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Die nach vorsichtigem Mischen weiß ausgefallene DNA

wurde 10 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Um eine bessere Resuspendierung der DNA zu erhalten, wurden die Proben vor der Verwendung über Nacht bei 4 °C gelagert. Für eine Langzeitlagerung wurde die genomische DNA bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.3.2 Isolierung extrachromosomaler DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „*Plasmid Miniprep Kit*“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Dafür wurden 12-16 Stunden kultivierte Flüssigkulturen verwendet.

#### 2.2.3.3 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurde das peqGold RNA Pure<sup>TM</sup> Reagenz, eine optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur Extraktion von RNA humanen, tierischen und bakteriellen Ursprungs, verwendet. Die *L. pneumophila*-Kulturen wurden auf eine OD<sub>660</sub> von 0,1-0,2 angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>660</sub> von 2,0 bis 2,2 für die Isolation nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die isolierte RNA wurde in 40 µl DEPC-Wasser gelöst und im Spektrophotometer vermessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

#### 2.2.3.4 Nukleinsäureverdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung

Die Restriktion mittels Typ II Restriktionsendonukleasen erfolgt spezifisch innerhalb ihrer, meist palindromen Erkennungssequenz an doppelsträngiger DNA. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) erworben und mit den dazu gehörigen Puffern in den jeweiligen Reaktionen eingesetzt. Für den Verdau von 1 µg DNA wurden 10 U an Enzym in einem Reaktionsvolumen von meist 30 µl verwendet und in Abhängigkeit der für das jeweilige Enzym vorgeschriebenen Temperatur und Reaktionszeit verdaut. Zur Überprüfung erfolgter Restriktion wurden die Fragmente auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In einzelnen Versuchansätzen wurde der geschnittene Vektor mit Hilfe der Antarctic Phosphatase, AP (NEB), dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu minimieren. Der hitzeinaktivierte DNA/Restriktionsenzym-Mix wurde für diese Reaktion ohne einen

zusätzlichen Reinigungsschritt verwendet. Nach Zugabe von AP-Puffer und 5 U an AP-Enzym wurde der Ansatz 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Zur Entfernung von Puffer- und Enzymresten wurden die Fragmente mit Hilfe des „*QIAquick PCR Purification Kit*“ (Qiagen) gereinigt und nach einer Konzentrationsbestimmung am Nanodrop-Gerät für Ligationsansätze (s. 2.2.3.5) eingesetzt.

#### 2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden ca. 50 ng an Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1:3 mit dem zu insertierenden DNA-Fragment vermischt und unter Zugabe von 400 U T4 DNA-Ligase für 15-18 h bei 16 °C inkubiert. Das Reaktionsvolumen des Ligationsansatzes betrug i. d. R. 10 µl. Nach der Inkubation erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C. Nach der anschließenden EtOH-Fällung (s. 2.2.3.6) erfolgte die Transformation in die jeweiligen Bakterienstämme.

#### 2.2.3.6 Fällung von Nukleinsäuren

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit einer Endkonzentration an 0,3 M Natriumazetat pH 7,0 und dem doppelten Volumenanteil an unvergälltem 95 %igen (v/v) EtOH vermischt und anschließend für 15 min bei 4 °C und  $16.000 \times g$  sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat mit 70 % (v/v) EtOH versetzt und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Trocknung des Pellet für ca. 15 min bei 37 °C und die Resuspension in 10 µl DEPC-Wasser.

#### 2.2.3.7 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Für das Auftrennen der Nukleinsäuren wurden in Abhängigkeit der zu detektierenden Bandengröße 1 bis 2 %ige Agarosegele in  $1 \times$  TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit ca. 0,2 Volumenanteilen Probenpuffer (s. Tabelle 2.5) versetzt und bei 100 V bis zur angestrebten Laufstrecke getrennt. Anschließend erfolgte eine Färbung der Nukleinsäurebanden für ca. 20 min im Ethidiumbromid-Bad (2 µg/ml EtBr in  $1 \times$  TAE). Zur Dokumentation wurde der UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm genutzt. Bei präparativen Gelen wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ (Qiagen) eluiert.

## 2.2.3.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR ist die exponentielle Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts (*template*) mit Hilfe von Oligonukleotidprimern und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Für in dieser Arbeit durchgeführte Klonierungen wurde die *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Kolonie-PCRs zur Analyse positiver Klone und Inverse PCRs wurden dagegen unter Verwendung der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25 µl angesetzt und hatten die in Tabelle 2.21 aufgeführte Zusammensetzung.

Tabelle 2.21: Reaktionsansatz für eine Standard- und eine Kolonie-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	1 Kolonie (Kolonie-PCR) bzw. 20-200 ng DNA	-	-
Thermo Pol Puffer	2,5	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTPs	0,25	10 mM jedes dNTP	0,1 mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,25	50 µM	0,5 µM
Oligonukleotid 2	0,25	50 µM	0,5 µM
DNA-Polymerase	1 ( <i>Pfu</i> ) bzw. 0,25 ( <i>Taq</i> )	2,5 U/µl bzw. 5 U/µl	0,1 U/µl bzw. 0,05 U/µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	zu 25 µl Gesamtansatz	-	-

Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten Produktes, wobei pro 1 kb eine Minute veranschlagt wurde. Ebenfalls wurde die Annealingtemperatur der Primer je nach berechneter Schmelztemperatur  $T_m$ , die sich nach dem GC-Gehalt der Primer richtet, spezifisch gewählt. Für die Kolonie-PCR wurde eine mit einem sterilen Zahnstocher gepickte Kolonie in einem PCR-Tube mit 10 µl DEPC-behandeltem Wasser (s. Tabelle 2.3) für 10 min bei 99 °C im Thermocycler lysiert. Anschließend wurde ein PCR-Mastermix, der die übrigen Komponenten enthielt, zugegeben und das in Tabelle 2.22 aufgeführte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 2.22: Programm für eine Standard- und Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95 °C	5 min
2. Denaturierung	30	95 °C	1 min
3. Primer-Bindung (Annealing)	30	50-65 °C	1 min
4. Synthese (Elongation)	30	72 °C	1 min pro kb
5. Finale Elongation	1	72 °C	10 min

Die resultierenden PCR-Produkte wurden auf 1 %igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls weiter gereinigt.

## 2.2.3.9 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Um zu bestimmen, ob ein Gen exprimiert wird, wurde die Methodik der reversen Transkription angewandt. Dafür wurde isolierte RNA (s. 2.2.3.3) durch den Einsatz von 2 U Turbo<sup>TM</sup>DNase (Ambion) pro 1 µg RNA von DNA-Kontaminationen befreit. Weiterhin wurden dem Ansatz 1 µl RNaseOUT<sup>TM</sup> (s. Tabelle 2.3) und DEPC- behandeltes Wasser zu einem Reaktionsvolumen von 10 µl hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Temperaturerhöhung auf 75 °C für 10 min inaktiviert. Anschließend wurde 1 µl des DNase-Restriktionsansatzes zur einzelsträngigen cDNA-Synthese und nachfolgenden Amplifikation des Produktes mit Hilfe des „OneStep RT-PCR“ Kits der Firma Qiagen eingesetzt.

Tabelle 2.23: Reaktionsansatz für eine RT-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
RNA	1	~ 100 ng/µl	5 ng/µl
OneStep RT-PCR Puffer	4	5-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTP Mix	0,8	10 mM jedes dNTP	0,4 mM jedes dNTP
RT-PCR Enzym-Mix	0,8	-	-
Oligonukleotid 1	0,3	50 µM	0,75 µM
Oligonukleotid 2	0,3	50 µM	0,75 µM
DEPC-H <sub>2</sub> O	12,8	-	-

Das Programm für die RT-PCR wurde nach den Angaben des Herstellers erstellt, wobei die Annealingtemperatur in Anhängigkeit der eingesetzten Oligonukleotide an das jeweilige Experiment angepasst wurde.

Tabelle 2.24: Programm für eine „OneStep“-RT-PCR

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1. Reverse Transkription	1	50 °C	30 min
2. Initiale PCR-Aktivierung	1	95 °C	15 min
3. Denaturierung	35	95 °C	40 sek
4. Primer-Bindung (Annealing)	35	50 °C	40 sek
5. Synthese (Elongation)	35	72 °C	1 min
6. Finale Elongation	1	72 °C	10 min

Zum Ausschluss jeglicher eventuell noch vorhandener DNA-Kontaminationen wurde bei jedem Experiment ein Ansatz mitgeführt, der nach Ablauf der Reversen Transkription zu den anderen Proben in den Thermocycler gestellt wurde. Die Amplifikate wurden nach erfolgter Reaktion auf einem 2 %igen (w/v) Agarosegel analysiert.

## 2.2.3.10 Inverse Polymerase Kettenreaktion

Zur Identifikation der Tn5-Insertionsorte in ausgewählten Transposonmutanten wurde die inverse PCR angewandt. Dazu wurde genomische DNA der Mutanten mit *HindIII*, *SphI* oder *PstI* verdaut, ligiert, gefällt (siehe 2.2.3.4 bis 2.2.3.6) und anschließend mit den Primer-Paaren KAN2-FP/ KAN2-RP oder Inv1-EZ/ Inv2-EZ in die Reaktion eingesetzt (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.25: Reaktionsansatz für eine inverse PCR

Komponente	[ $\mu$ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA (Ligationsansatz)	5	-	-
Thermo Pol Puffer	2,5	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTPs	0,5	10 mM jedes dNTP	0,2 mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,5	50 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Oligonukleotid 2	0,5	50 $\mu$ M	1 $\mu$ M
DNA-Polymerase	1	5 U/ $\mu$ l	0,2 U/ $\mu$ l
DEPC-H <sub>2</sub> O	zu 25 $\mu$ l Gesamtansatz		-

Die inversen PCRs wurden unter Verwendung des in Tabelle 2.26 aufgeführten Programms durchgeführt.

Tabelle 2.26: Programm für eine inverse PCR

Reaktionsschritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95 °C	1,5 min
2. Denaturierung	30	95 °C	30 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	30	54 °C	30 sek
4. Synthese (Elongation)	30	72 °C	4 min
5. Finale Elongation	1	72 °C	10 min

Die resultierenden PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen, Einzelbanden wurden mit dem „*Qiaquick PCR Purification Kit*“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und anschließend in einer Sequenzierreaktion eingesetzt.

## 2.2.3.11 Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion

Die DNA-Sequenzierung wurde basierend auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (201) unter Verwendung des „*ABI BigDye Terminator 3.1 Premix*“ (s. Tabelle 2.6) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Ablauf des PCR-Programms wurden in den nachfolgenden Tabellen beschrieben.

**Tabelle 2.27: Reaktionsansatz für eine Sequenzier-PCR**

Komponente	[ $\mu$ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	variabel	~ 300 ng/ $\mu$ l	~ 30 ng/ $\mu$ l
ABI Puffer	1,5	5-fach konzentriert	0,75-fach konzentriert
BigDye 3.1	1	-	-
Oligonukleotid	0,5	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M
DEPC-H <sub>2</sub> O	zu 10 $\mu$ l Gesamtansatz	-	-

**Tabelle 2.28: Programm für eine Sequenzier-PCR**

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	96 °C	1,5 min
2. Denaturierung	25	96 °C	30 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	25	54 °C	30 sek
4. Synthese (Elongation)	25	60 °C	4 min
5. Pause	$\infty$	4 °C	$\infty$

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion erfolgte durch Mitarbeiter des Robert Koch-Institutes. Mit Hilfe der „*Lasergene SeqMan*“ Software (s. Tabelle 2.20) wurde eine Analyse der Daten durchgeführt.

#### 2.2.3.12 Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA

Zur Generierung von Punktmutationen in einem Vektor wurde das „*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*“ von Stratagene nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurde folgender Ansatz gewählt:

**Tabelle 2.29: Reaktionsansatz für eine Mutagenese-PCR**

Komponente	Eingesetzte Menge/ Konzentration
Reaktionspuffer 10x	5 $\mu$ l
Plasmid DNA	50 ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
dNTP Mix (je 10 mM)	1 $\mu$ l
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1 $\mu$ l (2.5 U/ $\mu$ l)
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Das Programm wurde ebenfalls entsprechend der Herstellerangaben spezifisch angepasst:

**Tabelle 2.30: Programm für eine Mutagenese-PCR**

Reaktionsschritt	Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95 °C	30 sek
2. Denaturierung	16	95 °C	30 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	16	55 °C	1 min
4. Synthese (Elongation)	16	68 °C	1 min/ kb Plasmidlänge

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl *DpnI* pro Reaktionsansatz und ein Inkubationsschritt von 1 h bei 37 °C, um selektiv die metylierte DNA des Ursprungsplasmides zu verdauen. Von diesem Verdau wurde 1 µl zu 50 µl superkompetenten *E. coli* XL1-Blue gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte ein 45-sekündiger Hitzeschock bei einer Temperatur von 42 °C im Wasserbad. Der Ansatz wurde erneut für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 µl auf 37 °C temperiertes SOC-Medium hinzu gegeben und der Ansatz bei 37 °C und 250 rpm für eine Stunde geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde auf antibiotikahaltigem Selektivmedium ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Von den gewachsenen Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und der Basenaustausch mittels Sequenzierung überprüft.

## 2.2.4 Herstellung und Transformation von kompetenten Zellen

### 2.2.4.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Von einer *E. coli* DH5α-Übernachtskultur wurden 250 µl in 25 ml LB-Medium überführt. Diese Kultur wurde nochmals für 2 Stunden bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei 4 °C und 5.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem sich anschließenden Zentrifugationsschritt, der unter den obig genannten Bedingungen erfolgte, wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gelöst. Von dieser Suspension erfolgte die Zugabe von 40 µl Bakterienzellen zu 10 µl Ligationsansatz, der anschließend für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde der komplette Ansatz zu 1 ml LB-Medium, das bei 37 °C vorgewärmt wurde, gegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde nach einem Zentrifugationsschritt und anschließendem Verwerfen eines Großteils des Überstandes auf LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 2.2.4.2 Herstellung und Transformation elektrokompeter *L. pneumophila*

Zur Erzeugung elektrokompeter *L. pneumophila* wurde Koloniematerial von einer 1-2 d auf BCYE-Agar gewachsenen Kultur mit einem sterilen Wattetupfer entnommen und in 3 ml BYE-Medium resuspendiert bis eine OD<sub>660</sub> von ca. 1,8 erreicht wurde. Nach Abzentrifugieren



von 1 ml dieser Kultur bei  $4.500 \times g$  wurde das gewonnene Zellpellet dreimal mit je 1 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerol gewaschen. Die Zentrifugationsschritte erfolgten für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $4.500 \times g$  in einer bereits vorgekühlten Tischzentrifuge. Nach dem finalen Waschschrift wurde das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  10 %igem (v/v) Glycerol aufgenommen und in drei Aliquots zu je 20  $\mu\text{l}$  aufgeteilt, die entweder direkt für die Elektroporation verwendet oder bis zum Gebrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Für die Elektroporation wurden 20  $\mu\text{l}$  elektrokompente *L. pneumophila* mit 20 ng des entsprechenden Plasmides vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation im *Cell Porator* bei 330  $\mu\text{F}$ , 400 DC Volt und 4 k $\Omega$ . Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmter BYE-Bouillon wurden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  für 4-5 h bei 250 rpm geschüttelt und anschließend ausplattiert. Nach einer Inkubationsperiode von 3-4 Tagen bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank wuchsen auf den antibiotikahaltigen Selektivmedien Kolonien.

### 2.2.5 Transfektion von A549 Lungenepithelzellen

Von einer vollständig adhären mit A549 Lungenepithelzellen bewachsenen Zellkulturflasche wurde nach mikroskopischer Kontrolle auf Kontaminationen zunächst das alte Wachstumsmedium abgegossen. Nach 2-maligem Waschen mit bei  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmtem PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin/ EDTA (s. Tabelle 2.3) abgelöst. Dazu wurden die Zellen für ca. 3 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in den Brutschrank gestellt bis sie sich durch leichtes Klopfen gegen die Flasche ablösten. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml-Falcon für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml RPMI + 10 % FKS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100  $\mu\text{l}$  mit 100  $\mu\text{l}$  Trypanblau (s. Tabelle 2.3) vermischt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die A549 Zellen wurden in 24-well Platten, in die vorher bei mikroskopischen Versuchsansätzen sterile Deckgläschen eingelegt worden waren, eingesäht ( $5 \times 10^5$  Zellen pro well in 1 ml RPMI + 10 % FKS) und für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  adhären. Nach Abnahme des alten Mediums und Zugabe von 1 ml frischem RPMI + 10 % FKS wurden die Transfektionsreagenzien zugegeben. Pro zu transfizierendem well wurde folgender Ansatz hinzu gemischt: 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden mit 30  $\mu\text{l}$  RPMI (ohne FKS) versetzt und im Anschluss zu einer Lösung aus 20  $\mu\text{l}$  RPMI (ohne FKS) und 3  $\mu\text{l}$  Metafectene Pro® (s. Tabelle 2.3) pipettiert. Dieser Ansatz wurde ohne zu mischen (um die Zerstörung der Lipid-DNA-Komplexe durch Scherkräfte zu vermeiden) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin vorsichtig zu den Zellen gegeben. Nach einer 6-stündigen

Inkubationszeit im Zellkulturbrutschrank erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit RPMI + 10 % FKS und eine weitere Inkubationsperiode für 16 Stunden. Im Anschluss daran wurden die Zellen fixiert (s. 2.2.9) und der weiteren Verwendung zugeführt. Als Expressionskontrolle wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 100 µl PBS vermischt mit 10 µl 50× Protease-Inhibitor-Mix (s. Tabelle 2.3) pro *well* zu den Zellen gegeben und die Zellen komplett mit einem sterilen Spatel abgekratzt. Von dieser Zellsuspension wurden i. d. R. 20 µl mit 4 µl 5× Lämmli-Puffer vermischt, für 10 min bei 99 °C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde wie in Kapitel 2.2.13.4 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.6 Transfektion von U937 Makrophagen

Für dieses Experiment mussten die in Suspensionskultur vorliegenden U937 Monozyten zunächst durch Zugabe von PMA (1 mg/ml in DMSO; s. Tabelle 2.3) zu adhärent wachsenden Makrophagen ausdifferenziert werden. Dazu wurden 100 µl Monozyten mit 100 µl Trypanblau vermischt und die Lebendzellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurde die entsprechende Menge U937-Suspension mit RPMI + 10 % FKS in einer neuen Zellkulturflasche vermischt, so dass eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml erreicht wurde. Die U937 Monozyten differenzierten nach der Zugabe von PMA (1 mg/ml in DMSO) im Verhältnis 1:20.000, d. h. es wurden 5 µl PMA zu 100 ml Zellsuspension gegeben, innerhalb von 1,5 d bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zu Makrophagen aus. Für das Experiment wurden die Makrophagen zunächst in eine 24-*well* Zellkulturplatte eingesäht. Dazu wurde der Überstand abgegossen und die Zellen wurden mit 0,2 % EDTA in PBS nach einer 5-minütigen Inkubation im Brutschrank abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in einem 50 ml-Falcon für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml RPMI resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl mit 100 µl Trypanblau vermischt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Makrophagen in der entsprechenden Menge RPMI-Medium ohne Zusatz resuspendiert und es erfolgte die Aussaat von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in jedes *well* der 24-*well* Platte, in die vorher bei mikroskopischen Versuchsansätzen sterile Deckgläschen eingelegt worden waren. Nachdem die Makrophagen für ca. 2 h adhärert wurden, erfolgte die Transfektion wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben.

### 2.2.7 Depletion von Cholesterol in A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen

Eine Reduktion des Cholesterolgehaltes in U937 Monozyten, die Cholesterol nicht endogen synthetisieren können, wurde durch Bumba und Mitarbeiter beschrieben (202). Die U937 Monozyten wurden für 48 h in RPMI + 10 % Lipoprotein-defizientes FKS (s. Tabelle 2.3) unter Zugabe von PMA adhärirt und wie unter 2.2.6 beschrieben transfiziert. Der Nachweis der Reduktion von Cholesterol erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie (s. 2.2.11.4). A549 Lungenepithelzellen wurden für 7 d in RPMI + 10 % Lipoprotein-defizientes FKS kultiviert und in Transfektionsexperimenten (s. 2.2.5) eingesetzt. Da diese Form der Kultivierung einen Verlust der Adhärenz bei diesen Zellen beinhaltet, wurden alle Medienwechsel oder Waschschrte durch eine vorübergehende Überführung in Eppendorf-Gefäße durchgeführt.

### 2.2.8 Infektion von *Acanthamoeba castellanii* und U937 Makrophagen

#### 2.2.8.1 Infektion von *A. castellanii*

Die Amöben wurden für 3 Tage in PYG-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und danach durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Gegenfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm für 10 min wurden die Amöben in der entsprechenden Menge Infektionsmedium resuspendiert, so dass sie mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 24-well Platte eingesäht werden konnten. Die für die Infektion verwendeten *L. pneumophila* Stämme wurden nach einem 2-tägigen Wachstum auf BCYE-Agar mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte abgenommen und in Infektionsmedium auf eine OD<sub>660</sub> von 0,3 ( $1\text{--}5 \times 10^8$  Zellen pro ml) eingestellt. Danach wurde die Suspension  $10^3$ -fach/ $10^4$ -fach mit Infektionsmedium verdünnt, was einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Bakterien/ml bzw.  $1 \times 10^4$  Bakterien/ml entspricht. Das Verhältnis von Bakterien zu Amöben wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet und entspricht in diesen Ansätzen einem Wert von 1 bzw. 0,1. Pro Zeitpunkt wurden drei Parallelansätze koinfiziert. Nach 0, 24, 48 und 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden je 100 µl aus den wells entnommen, der Inkubationszeit entsprechend verdünnt und 50 µl zur Bestimmung der Bakterienzahl auf BCYE-Platten in logarithmisch abnehmender Menge mit dem „Whitley Spiral Plater“ ausplattiert. Auch das Inoculum wurde ausplattiert. Anhand der Zählung koloniebildender Einheiten CFU (*colony forming units*) mit Hilfe des Acolyte-Koloniezählgerätes, wurde die Entwicklung der Zellzahl, die als Maßstab für die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen anzusehen ist, bestimmt.

### 2.2.8.2 Infektion von U937 Makrophagen

Die durch Zugabe von PMA ausdifferenzierten Makrophagen wurden wie unter 2.2.6 beschrieben mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in eine 24-*well* Platte eingesäht, in die vorher bei mikroskopischen Ansätzen sterile Deckgläschen eingelegt wurden. Nachdem die Zellen 2 h adhären konnten, erfolgte die Infektion mit verschiedenen *Legionella*-Stämmen mit einer MOI von 100. Dazu wurden die 2 Tage auf BCYE-Agar kultivierten Legionellen in RPMI auf eine OD<sub>660</sub> von 0,3 ( $1\text{--}5 \times 10^8$  Zellen pro ml) eingestellt und je 1 ml dieser Suspension wurde zu den adhären Zellen, bei denen vorher das Medium abgenommen wurde, zugegeben. Die Platten wurden anschließend für 10 min bei  $800 \times g$  zentrifugiert und für weitere 10 min in den Brutschrank gestellt. Im Anschluss daran wurden die *wells* dreimal mit jeweils 1 ml RPMI + 0,1 mg/ml Gentamicin gewaschen, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Es wurden jeweils drei verschiedene Infektionszeitpunkte nach 20 min, 1 h und 8 h betrachtet. Die Platten für den 1 h- und 8 h-Infektionszeitpunkt wurden nach dem letzten Waschschrift für 1 h mit RPMI + 0,1 mg/ml Gentamicin inkubiert. Bei der Platte für den 8 h-Wert wurde im Anschluss an diesen Inkubationsschritt das Medium gegen RPMI + 10 % FKS ausgewechselt. Wenn die verschiedenen Infektionszeitpunkte erreicht wurden, erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und bei mikroskopischen Ansätzen die Fixierung mit 3 % PFA in PBS wie in 2.2.9 beschrieben. Die Proben wurden anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung (s. 2.2.10.2) unterzogen und mikroskopiert. Aus den *wells* wurden vor der Fixierung Sterilkontrollen auf LB-Agar angefertigt. Als Expressionskontrolle diente ein Western Blot. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 100 µl PBS vermischt mit 10 µl 50× Protease-Inhibitor-Mix pro *well* zu den Zellen gegeben und die Zellen komplett mit einem sterilen Spatel abgekratzt. Von dieser Zellsuspension wurden i. d. R. 20 µl mit 4 µl 5× Lämmli-Puffer vermischt, für 10 min bei 99 °C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde wie in Kapitel 2.2.13.4 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.9 Fixierung von Zellen und Bakterien

Nach Abnahme des Mediums bzw. des Überstandes wurden die Zellen zunächst 2-malig durch Zugabe von 1 ml PBS pro *well* bei adhären Zellen bzw. durch Zugabe von PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Zellsuspensionen gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von je 500 µl 3 % Paraformaldehyd in PBS pro *well*/Eppendorf-Reaktionsgefäß und eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Bei

Transfektionsexperimenten wurden die Deckgläschen mit den adhären Zellen dreimal in einem Becherglas mit A. dest. gespült. Nachdem sie getrocknet waren, erfolgte eine Einbettung in *Pro Long® Gold antifade reagent with DAPI* (s. Tabelle 2.3) mit anschließender Aushärtung über Nacht bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Die Proben konnten daraufhin mikroskopiert werden.

### 2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung von Präparaten

#### 2.2.10.1 Immunfluoreszenzfärbung von *Legionella*-Kulturen

Von einer *Legionella*-Flüssigkultur mit einer OD<sub>660</sub> von 2,0 wurde 1 ml abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Währenddessen wurden auf Objektträgern mit Liquid-Barrier Marker (s. Tabelle 2.3) Begrenzungen, die ein Verlaufen der Proben verhindern, gezogen. Diese wurden mit je 20 µl 0,01 % Poly-L-Lysin *gecoated*. Nach der Fixierung der Bakterien (s. 2.2.9) wurden je 30 µl Bakteriensuspension mit entweder 2 oder 4 mg/ml Lysozym, 0,05 % Triton X-100, 0,05 % SDS, 0,1 % Saponin oder 5 mM EDTA vermischt, auf die Felder gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte fanden in einer feuchten Kammer statt. Zuerst wurde ein *Blocking*-Schritt mit PBS + 50 mM NH<sub>4</sub>Cl + 5 % Ziegen Serum (s. Tabelle 2.3) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt. Sowohl der Primärantikörper gegen den Flag-Tag als auch der anti-Maus Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper wurden 1:300 in PBS + 5 % Ziegen Serum verdünnt und für jeweils 1 h auf den Proben inkubiert. Da Saponin nur temporäre Poren ausbildet, wurde in diesem Fall sowohl dem *Blocking*- als auch den Antikörper-Puffern 0,1 % Saponin zugesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und nach dem letzten Waschschritt mit A. bidest. gespült. Zum Schluss wurde ein Tropfen *Pro Long® Gold antifade reagent with DAPI* auf die Proben gegeben und das Ganze mit einem Deckgläschen versiegelt.

#### 2.2.10.2 Immunfluoreszenzfärbung von U937-Infektionen

Alle Inkubationsschritte für dieses Experiment wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurde ein 20 µl-Tropfen der jeweiligen Lösung auf Parafilm pipettiert und das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite darauf gelegt. Zu Beginn wurden die Deckgläschen aus den *well*-Platten entnommen und zum Waschen mehrmals in Gläschen mit PBS getaucht. Das Permeabilisieren und Blocken der Proben erfolgte in einem

Versuchsansatz durch Inkubation in PBS + 0,1 % Saponin + 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 5 % Ziegenerum für 1 h bei 37 °C. In einem anderen Versuchsansatz wurden die Proben zunächst in PBS + 0,5 % SDS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und mit PBS + 5 % Ziegenerum + 10 mg/ml BSA für 30 min ebenfalls bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit den Antikörpern in folgender Reihenfolge: anti-*Legionella*, anti-Kaninchen Alexa Fluor 594, anti-Flag und anti-Maus Alexa Fluor 488. Diese wurden entweder in PBS + 0,1 % Saponin + 5 % Ziegenerum oder im Versuchsansatz mit SDS in PBS + 5 % Ziegenerum + 10 mg/ml BSA entsprechend der in Tabelle 2.6 angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Objektträger fünfmal mit PBS + 0,1 % Saponin oder nur PBS gewaschen und in *Pro Long® Gold antifade reagent with DAPI* eingebettet. Nachdem die Proben über Nacht bei Dunkelheit ausgehärtet waren, wurden sie mit Nagellack fixiert und mikroskopiert.

### 2.2.11 Nachweis von Phospholipaseaktivität

#### 2.2.11.1 Gewinnung von bakteriellen Zellpelletlysaten und Kulturüberständen

Nach Erreichen der gewünschten Optischen Dichte einer Bakterienkultur (meist  $\text{OD}_{660}=2,0$ ), wurde 1 ml dieser Kultur entnommen und bei  $5000 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 3 mM (final) Natriumazid versetzt und bei 4 °C für maximal 2 Tage gelagert. Die Lyse der Zellpellets erfolgte durch Zugabe von 0,1 % Triton X-100 und 50 µl Lysozym (10 mg/ml) und einem nachfolgenden Inkubationsschritt für 30 min bei 37 °C im Thermomixer. Anschließend wurde das Zellpelletlysate durch mehrmaliges Aufziehen mittels einer 26 G-Kanüle homogenisiert und mit 40 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 25°C) auf das Ausgangsvolumen von 1 ml aufgefüllt. Auch die Lysate wurden nur für maximal 48 h bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.11.2 Verdau von Lipidsubstraten

Zur Bestimmung der lipolytischen Aktivität wurden verschiedene Substrate (s. Tabelle 2.4) sowohl mit *L. pneumophila* Zellpelletlysaten und Kulturüberständen als auch gereinigten Proteinen inkubiert. Dafür wurden die eingesetzten Lipide in einer Endkonzentration von 13,4 mM und unter Zusatz von 6 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 % Triton X-100 und 40 mM Tris-HCl (pH 7,5, 25 °C) angesetzt. Die Substrate wurden zunächst 10 min bei RT und anschließend für 30 min bei

37 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Förderung der Formation von kleineren Phospholipid-Mizellen erfolgte eine Ultraschallbehandlung von jeweils drei 15-sekündigen Intervallen bei einer Intensität von 65 %. Im Anschluss daran wurden die Substrate in 96-well Mikrotiterplatten im Verhältnis 1:1 mit den zu analysierenden Proben (je 25 µl) versetzt und für die im Ergebnisteil angegebenen Zeitspannen bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm inkubiert. Die *L. pneumophila* Lysate wurden 1:50 in 40 mM Tris-HCl verdünnt in die Reaktion eingesetzt, da die starken zellassozierten PLA-Aktivitäten die Substrate andernfalls bereits nach kurzer Inkubationsdauer bis über die Sättigungsgrenze der Messbarkeit verdaut hätten, was eine Überdeckung geringerer Aktivitätsunterschiede zur Folge hätte. Bei der Inkubation von *Legionella*-Kulturüberständen wurde BYE-Bouillon und entsprechend für die Zellpelletlysate 40 mM Tris-HCl als Negativkontrolle eingesetzt. Wurde das Experiment mit gereinigten Proteinen, die in PBS gelöst waren durchgeführt, diente PBS als Pufferkontrolle. Die Negativkontrolle wurde stets mitgeführt und als Basiswert bei anschließenden Kalkulationen vom Probenwert subtrahiert. Im Anschluss an die Inkubation der Lipid-Proben-Suspension erfolgte die Bestimmung der Menge freigesetzter Fettsäuren.

#### 2.2.11.3 Messung der freien Fettsäuren

Die durch lipolytische Aktivität freigesetzten Fettsäuren wurden mit Hilfe des „Nefa HR2“ Kits der Firma Wako Chemicals, das nach den Angaben des Herstellers angewendet wurde, nachgewiesen. Durch den im Kit enthaltenen Oleinsäurestandard wurde die Konzentration der freien Fettsäuren anhand einer Standardkurve mit Hilfe der Standardkonzentrationen 0/ 0,2/ 0,4/ 0,6/ 0,8 und 1,0 mM freie Fettsäuren, ermittelt.

#### 2.2.11.4 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie

Die Extraktion verschiedener Lipide aus humanen A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen wurde basierend auf der Methode von Bligh und Dyer (203) durchgeführt. Jeweils 100 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 400 µl Methanol und 200 µl Chloroform für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden 280 µl A. bidest. und 200 µl Chloroform zugegeben und die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Für eine gründliche Phasentrennung wurden die Proben anschließend für 5 min bei  $2.000 \times g$  zentrifugiert. Die obere wässrige Phase sowie die weiße Zwischenphase wurden verworfen und die, die Lipide enthaltende Chloroformphase wurde für 45 min bei 30 °C in der *Speed Vac* evaporiert. Die getrockneten Lipide wurden

anschließend in 25 µl Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen bevor von jeder Probe 10 µl mittels einer Kapillare auf Kieselgelplatten aufgetragen wurden. Als Lipidreferenz wurde je 1 µl der entsprechenden Lipidlösung (10 mg/ml) aufgetragen. Zur Detektion von Cholesterol und seiner veresterten Form wurde die beladene Kieselgelplatte mit Filterpapier leicht schräg in eine Glaskammer gestellt, die zuvor mit einem Laufmittel bestehend aus Petrolether: Diethylether und Essigsäure [90:10:1 (v/v/v)] gefüllt wurde. Nach ca. 40 min wurde die Kieselgelplatte aus der Kammer entnommen und unter dem Abzug kurz getrocknet. Zur Detektion der Lipide wurden die Kieselgelplatten kurz in einer Schale mit Wasser gewaschen, anschließend für ca. 1-2 min mit 0,2 % Naphtolblauschwarz in 1 M NaCl inkubiert und schließlich mit 1 M NaCl gespült, bis die Lipidspots gut sichtbar waren (204).

#### 2.2.11.5 Hämolysassay

In Anlehnung an Kirby et al. (69) wurden 75 µl humanes Erythrozytenkonzentrat in 20 ml PBS bei 4 °C für 5 min bei  $10.000 \times g$  sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit jeweils 20 ml PBS gewaschen und anschließend in 20 ml PBS resuspendiert. Die zu untersuchenden *Legionella*-Stämme wurden 2 Tage auf BCYE-Platten mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert und für den Versuch in PBS-Puffer auf eine OD<sub>660</sub> von 0,3 eingestellt. Anschließend wurden 400 µl der Bakteriensuspension mit 400 µl der Erythrozytensuspension vermischt und für 2 min bei  $16.000 \times g$  pelletiert, um einen direkten Kontakt zwischen Bakterien und Blutzellen zu ermöglichen. Die Proben wurden für die im Ergebnisteil angegebenen Zeitintervalle bei 37° C inkubiert und im Anschluß daran für 5 sek gevortext. Nach einem 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei  $16.000 \times g$  wurden 100 µl des Überstandes in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 415 nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) vermessen. Als Lysekontrolle wurden statt der Bakteriensuspension 400 µl 70 %iger Ethanol eingesetzt, als Negativkontrolle diente PBS-Puffer.

### 2.2.12 Expression und Reinigung von Proteinen

#### 2.2.12.1 Proteinexpression und Zellaufschluss

Eine 500 ml- *E.coli* BL21 Expressionskultur wurde etwa zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>660</sub> 0,6-0,8) mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und nach 4-stündiger Schüttelinkubation bei 4 °C für 10 min bei  $10.000 \times g$  pelletiert und über



Nacht bei -20 °C eingefroren. Für den Zellaufschluss wurden die Proben auf Eis mit 1 × Proteaseinhibitormix versetzt und in 10 ml Proteinbindepuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C3 (s. Tabelle 2.1) bei bis zu 20.000 psi, was einem Druck von ca. 1.400 bar entspricht. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 10.000 × g für 60 min zentrifugiert und der Überstand mittels Passagieren durch einen 0,2 µm Filter von möglichen Zelltrümmern befreit.

#### 2.2.12.2 Reinigung von His<sub>6</sub>-markierten Proteinen

Die Reinigung der Proteine erfolgte am FPLC-System Äkta Prime. Dafür wurden die im Überstand enthaltenen mit Hexahistidin-*Tags* markierten Proteine auf nach Herstellerangaben äquilibrierte Histrap HP Säulchen (1 ml) von Amersham mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min geladen und mit Elutionspuffer (500 mM Imidazol) eluiert. Laut Chromatogramm bezüglich des Proteingehaltes relevant erscheinende Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE auf ihren Reinheitsgrad hin untersucht. Der Proteingehalt wurde mit der 1 × Roti-Nanoquant Fertiglösung bestimmt. Fraktionen, welche die gesuchte Proteinbande enthielten wurden gegebenenfalls kombiniert und über Nacht bei 4 °C in PBS oder TBS unter Verwendung spezieller Dialyseschläuche (s. Tabelle 2.3) dialysiert. Am Folgetag wurde erneut die Proteinkonzentration ermittelt. Die Experimente wurden zeitnah mit den auf Eis bei 4 °C im Kühlschrank gelagerten Proteinlösungen durchgeführt, d. h. die Reinigung der Proteine lag maximal einen Monat zurück.

### 2.2.13 Proteinanalytik

#### 2.2.13.1 Fällung von Proteinen mittels TCA-EtOH

Um den Proteingehalt einer Probe zu konzentrieren, wurde die Trichloressigsäure-Ethanol-Präzipitation nach Lebendiker angewandt<sup>1</sup>. Dazu wurden 100 µl einer zu konzentrierenden Proteinprobe mit 900 µl ddH<sub>2</sub>O vermischt und nach Zugabe einer 20 %igen (w/v) TCA-Lösung für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 16.000 × g, wurde das Pellet 2 × mit 1 ml eiskaltem EtOH gewaschen und anschließend für 15 min bei 30 °C in der Speed Vac getrocknet. Nach Resuspension in der gewünschten Menge SDS-Ladepuffer, wurde die Probe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

---

<sup>1</sup> <http://wolfson.huji.ac.il/purification>

### 2.2.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte basierend auf der Bradford-Methode mittels der Färbelösung „*Roti Nanoquant*“ (s. Tabelle 2.3) nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.13.3 Eindimensionale (1D) – SDS-PAGE

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen erfolgte in 7,5-10 %igen SDS-Tris-Polyacrylamidgelen (s. Tabelle 2.5) nach der Methode von Laemmli (205). Dazu wurden die Proben mit der entsprechenden Menge reduzierendem Protein-Probenauftragspuffer versetzt, 10 min bei 99 °C und 800 rpm im Thermomixer denaturiert und in SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 2.5) bei konstanten 150 V aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine im Gel wurden die zwei nachfolgend aufgeführten Färbemethoden angewandt:

#### a) Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in kolloidal Coomassie-Färbelösung nach Rezept des Herstellers auf einem Schwenker inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel für 5-10 Stunden in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und im Anschluss daran zur Dokumentation gescannt.

#### b) Silberfärbung von Proteinen

Zur Erhöhung der Detektionsgrenze bei sehr geringen Proteinkonzentrationen wurde die Nachweismethode der Silberfärbung angewandt. Diese erfolgte mit Hilfe des Massenspektrometrie-kompatiblen „*FireSilver Staining Kit*“ der Proteome Factory (s. Tabelle 2.7), das laut einer persönlichen Mitteilung des Herstellers auf der Silberfärbung nach Blum (206) basiert, nach einem mitgelieferten Protokoll.

### 2.2.13.4 Western Blot und Immundetektion

Nach der Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (s. 2.2.13.3) auf eine Membran, können diese mittels spezifischer Antikörper (s. Tabelle 2.6) im Western Blot-Verfahren nachgewiesen werden. Die verwendete PVDF-Membran wurde zunächst für ca. 1 min unter Schwenken mit 100 %igem Methanol aktiviert und anschließend in Wasser

äquibriert. Der Aufbau des Blots, der im Semidry-Elektroblotter (Pharmacia) durchgeführt wurde, begann mit der anodenseitigen Auflage von zwei in Transferpuffer getränkten Whatman Papieren, die vorher auf Gelgröße zugeschnitten wurden. Darauf wurde die äquibrierte und ebenfalls auf die Größe des Geles zugeschnittene PVDF-Membran gelegt. Auf die Membran wurde das SDS-PAGE Gel luftblasenfrei aufgelegt und mit zwei weiteren getränkten Whatman Papieren bedeckt. Nach Auflegen der Kathode wurden Proteine mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gel für 1 h bei RT auf die Membran übertragen. Anschließend erfolgte das Blocken der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS-T mit 5 % Milchpulver. Danach wurde der primäre Antikörper in PBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt, auf die Membran gegeben und das Ganze über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bevor die Sekundärantikörperlösung, die HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelte Antikörper enthielt und ebenfalls in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur über die Membran geschwenkt wurde, zugegeben wurde, erfolgten drei jeweils 15-minütige Waschschrte in PBS-T Lösung. Nach drei abschließenden 15-minütigen Waschschrten mit PBS-T erfolgte die Detektion des Zielproteins mit dem „ECL Plus Western Blotting Detection Reagent“ (Amersham) nach den Angaben des Herstellers. Die bei dieser Methode auftretende Chemilumineszenz wurde mit einer hochauflösenden CCD-Kamera im Chemilumineszenz-Imager der Firma Vilber Lourmat aufgenommen.

#### 2.2.14 Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen mittels Pull Down-Assay

Um mögliche Protein-Interaktionspartner von PatA zu identifizieren, wurde ein Pull Down-Assay mit dem „ProFound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit“ der Firma Thermo Scientific (s. Tabelle 2.7) nach Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 600 µg der gereinigten inaktiven Proteinvariante PatAS73A (s. 2.2.12.2) über dessen N-terminalen  $6 \times \text{His-Tag}$  als „Köder-Protein“ an eine Kobalt-Chelat-Harz-Matrix gekoppelt. Dies geschah durch eine 5-stündige Inkubation bei 4 °C auf einem Rotator. Während der Inkubation wurde das „Beute-Protein-Lysat“, das entweder aus A549 Lungenepithelzell- oder U937-Makrophagenzelllysat bestand, entsprechend des vorgegebenen Protokolls vorbereitet und die Konzentration der im Lysat enthaltenen Proteine bestimmt. Im Anschluss daran wurden 3,5 mg Protein des U937-Lysates und 5 mg Protein des A549-Lysates in einem Volumen von bis zu 800 µl auf die Säulchen, die das immobilisierte Polyhistidin-getaggte PatA enthielten, gegeben und für 16 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Nachdem die im Protokoll vorgegebenen fünf Waschschrte durchgeführt wurden, erfolgte eine einmalige Elution der

Proteine aus den Säulchen. Die Eluate wurden anschließend auf einem SDS-Gel analysiert. Dazu wurde jeweils 1 µl des gereinigten PatAS73A-Proteins, des humanen Zelllysates und der beiden Durchflüsse und je 10 µl der Waschfraktionen und Eluate aufgetragen. Als Kontrollen wurden jeweils zwei weitere Säulchen mitgeführt: eine „*bait*-Kontrolle“, die nur gereinigtes PatAS73A enthielt und eine „*prey*-Kontrolle“, die nur aus A549- bzw. U937-Zelllysate bestand. Um auch Proteine geringer Konzentrationen detektieren zu können, wurden sowohl die beiden Kontroll-Eluate als auch das Eluat des „*bait-prey*-Komplexes“ komplett mit TCA-EtOH (s. 2.2.13.1) gefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Hilfe des Massenspektrometrie-kompatiblen „*FireSilver Staining Kit*“ (s.2.2.13.3) gefärbt. Proteinbanden, die im Eluat des „*bait-prey*-Komplexes“ zusätzlich auftraten und in den beiden Kontrollen nicht zu sehen waren, wurden als mögliche interagierende Proteine angesehen, ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse geschickt (s. 2.2.15).

### 2.2.15 Identifikation von Proteinbanden mittels Massenspektrometrie

Die Proteinidentifikation durch nanoLC-ESI-MS/MS Analyse inklusive vorherigem Trypsin-Verdau und NCBI Proteindatenbanksuche erfolgten durch die Firma *Proteome Factory* in Berlin. Der massenspektrometrischen Analyse war ein Verdau der Proteinbanden mit Trypsin, eine Serinprotease, die Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin hydrolytisch spaltet, voran gestellt. Nachdem die resultierenden Peptidfragmente im Massenspektrometer entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt wurden, erfolgte die Identifikation der Proteine über das Programm „MASCOT Search“<sup>1</sup> ebenfalls durch Mitarbeiter der *Proteome Factory* Berlin. „MASCOT Search“ vergleicht die im Massenspektrometer analysierten Peptid-Spektren mit Spektren theoretischer Spaltungen der in der Datenbank hinterlegten Proteine. Aus einer statistischen Auswertung der Übereinstimmungen resultiert eine Auswahl an Proteinidentitäten, für die jeweils ein „*Protein Score*“ angegeben wird, der umso größer ist, je höher die Wahrscheinlichkeit für eine richtige Identifikation des Proteins ist (207).

---

<sup>1</sup> <http://www.matrixscience.com>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Suche und Identifizierung neuer Hämolyse-assoziiierter *Legionella* Gene

##### 3.1.1 Screening einer *Legionella*-Tn5 Insertionsmutanten-Klonbank auf Mutanten mit verändertem hämolytischen, lipolytischen und proteolytischen Potential

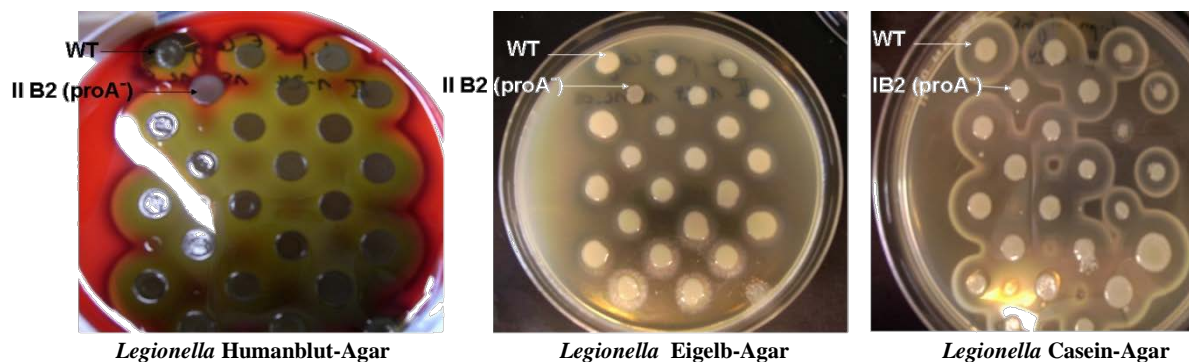
Als Ausgangspunkt dieser Arbeit diene eine in Vorarbeiten generierte Transposon-mutagenisierte Klonbank der *Legionella pneumophila* Stämme JR32 (insgesamt 9625 erzeugte Mutanten) und Corby (insgesamt 9206 erzeugte Mutanten), die zunächst in 96-*well* Platten vereinzelt wurde. Dabei wurden insgesamt 1751 Klone des Stammes JR32 sowie 1369 Klone des Stammes Corby vereinzelt. Zur Identifikation von Mutanten, die in ihrem lytischen Verhalten vom jeweiligen Wildtyp abwichen, wurden verschiedene Detektions- oder „Screening“-Agarplatten eingesetzt. Um abweichende Phänotypen hinsichtlich hämolytischer Aktivität zu finden, diene Humanblut-Agar. Ebenso wurde das lipolytische Verhalten auf Eigelb-Agar und proteolytische Aktivität auf Casein-Agar, sowie das allgemeine Wachstum auf BCYE-Agar untersucht. Die Klonbank wurde mittels eines 48-*well*-Replikators auf die Agarplatten überimpft. Nach ca. 3-tägiger Inkubation bei 37 °C konnte die hämolytische Aktivität der Klone anhand der Größe des Hämolysehofes um die Kolonien beurteilt werden. Das proteolytische Verhalten zeigte sich dagegen bereits nach 1-tägiger Inkubation im Brutschrank durch eine Aufklärung des Agars um die Kolonien und die Bildung eines milchig-weißen Präzipitatrings um die aufgeklärte Zone. Auch lipolytische Aktivität konnte nach ca. 3 Tagen anhand eines lytischen Hofes um die Kolonien detektiert werden. Diese aufgeklärte Zone könnte der Aktivität von Phospholipasen zuzuschreiben sein, die das im Agar enthaltene Lecithin zu wasserlöslichem Lysolecithin umsetzen (208, 209).

Insgesamt wurden 1152 Klone des Stammes *L. pneumophila* JR32 *gescreent*. Davon besaßen 27 Klone bezugnehmend auf den Wildtyp ein abweichendes Lyseverhalten.

**Tabelle 3.1:** Übersicht *gescreenter* Mutanten der *L. pneumophila* Stämme JR32 und Corby mit verändertem lytischen Verhalten im Vergleich zum Wildtyp. (+ verstärkte Aktivität, - verringerte Aktivität gegenüber dem jeweiligen Wildtyp)

<i>L. pneumophila</i> Stamm	Anzahl <i>gescreenter</i> Klone	Hämolyse		Lipolyse		Proteolyse	
		+	-	+	-	+	-
<b>JR32</b>	1152	10	17	0	2	0	1
<b>Corby</b>	910	10	13	0	2	0	1

Innerhalb dieser Mutanten zeigten 17 ein reduziertes Hämolyseverhalten, von denen ein Klon zusätzlich noch geringere lipolytische Aktivität aufwies und ein anderer Klon dieser Gruppe durch reduziertes lipolytisches als auch proteolytisches Verhalten auffiel (s. Tabelle 3.1). Zehn Mutanten von *L. pneumophila* JR32 zeigten dagegen eine stärkere Hämolyse als der Wildtyp. Durch ein Screening von insgesamt 910 Mutanten des Stammes *L. pneumophila* Corby konnten 13 Klone mit reduzierter sowie 10 Klone mit verstärkter hämolytischer Aktivität gegenüber dem Wildtyp identifiziert werden. Eine dieser Mutanten besaß zusätzlich noch eine verringerte lipolytische Aktivität. Interessant war, dass bei einer Mutante kein auf den Agarplatten detektierbares hämolytisches, proteolytisches und lipolytisches Verhalten beobachtet werden konnte (s. Abbildung 3.1). Für diese Mutante, die entsprechend ihrer Position in der 96-deep well- Platte IIB2 genannt wurde, konnte im folgenden festgestellt werden, dass sie eine Transposon-Insertion im Gen, das für die Zink-Metalloprotease ProA codiert, besitzt. Diese Protease ist essentiell für die Aktivierung der hauptsächlich sekretierten Glyzerophospholipid-Cholesterol Azytransferase von *L. pneumophila* PlaC (112). Dass eine Inaktivierung der proteolytischen Aktivität durch Transposoninsertion mit einem Verlust des hämolytischen und zytotoxischen Phänotyps einhergeht, wurde bereits gezeigt (144). Das Auffinden dieser *proA*-Mutante belegt weiterhin die Wirksamkeit des Screens.

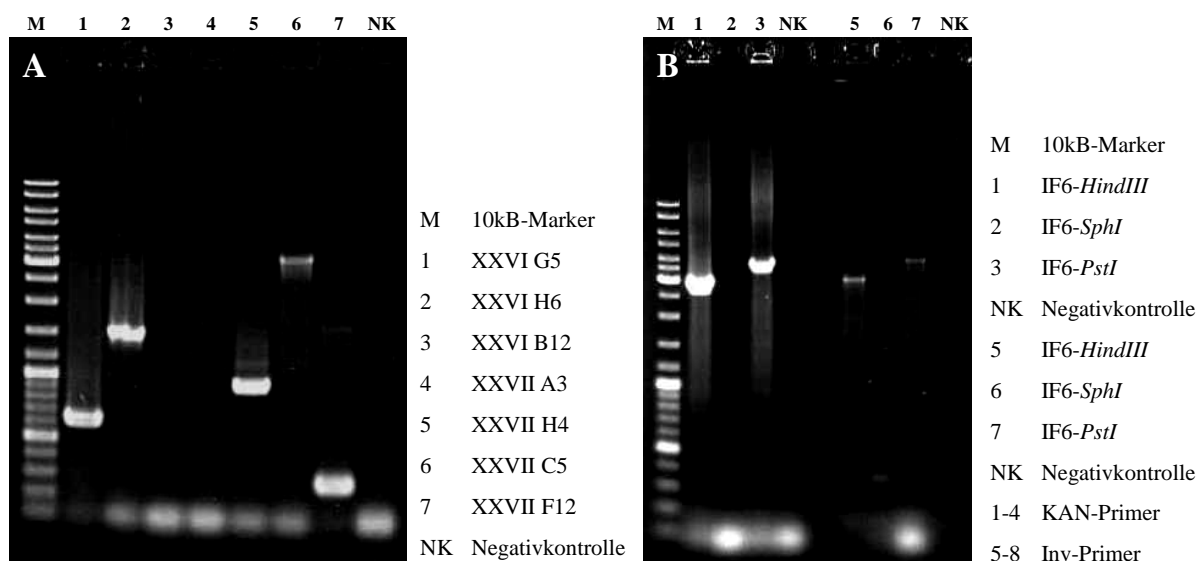


**Abbildung 3.1: Screening vereinzelter Klone der *L. pneumophila* Corby Tn5-Klonbank auf *Legionella* Humanblut-, Eigelb- und Casein-Agar.** Die Aktivität der einzelnen Klone wurde anhand der entstandenen Höfe um die Kolonien beurteilt. Jeweils in der oberen linken Ecke wurde der Corby Wildtyp (WT) aufgetragen. Der Klon IIB2 mit einer Tn5-Insertion im für die Zink-Metalloprotease ProA codierenden Gen besaß auf den Agarplatten keine detektierbare hämolytische, lipolytische oder proteolytische Aktivität.

Da auf den Detektionsagarplatten vorrangig Klone mit verändertem hämolytischen Potential detektiert werden konnten, stand bei der weiteren Vorgehensweise vor allem die Identifikation Hämolyse-assoziiierter Gene im Vordergrund.

### 3.1.2 Identifikation der Tn5-Insertionsorte im Chromosom ausgewählter Mutanten

Zur Amplifikation unbekannter Sequenzen, die *up-* und *downstream* des Transposon-Insertionsortes liegen, wurde die inverse PCR, die im Jahre 1988 durch Ochman und Mitarbeiter entwickelt wurde, eingesetzt (210). Das Prinzip der inversen PCR ist der Verdau einer *template*-DNA (genomische DNA der *Legionella*-Mutanten), in der ein Teil der Sequenz bekannt ist (Transposonsequenz), mit einem Restriktionsenzym und einer anschließenden Religation der Fragmente. Die dadurch entstandenen ringförmigen DNAs dienten als *template* für Oligonukleotidprimer, die so konstruiert wurden, dass sie voneinander weg gerichtet nach außen aus der Tn5-Sequenz heraus amplifizieren und so ein Produkt, dessen innere Region aus der unbekannten Sequenz um das Transposon herum besteht, ergaben. Durch Sequenzierung des entstandenen PCR-Produktes konnte anschließend der Insertionsort ermittelt werden. Die Ergebnisse der inversen PCR einiger Mutanten sind in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2: Inverse PCR zur Identifikation der Tn5-Insertionsorte im Chromosom ausgewählter *Legionella*-Mutanten.** Abbildung A zeigt fünf entstandene PCR-Produkte von sieben *L. pneumophila* JR32 Mutanten, deren genomische DNA mit *HindIII* verdaut wurde. In Abbildung B ist das Ergebnis der inversen PCR der *L. pneumophila* Corby-Mutante IF6 dargestellt. Die genomische DNA dieser Mutante wurde in verschiedenen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *SphI* und *PstI* verdaut, ligiert und anschließend mit den Primerpaaren KAN-2FP-1/ KAN-2RP-1 und Inv-1 EZTN/ Inv-2 EZTN amplifiziert.

Da die inverse PCR zunächst nicht in allen Fällen zu einem Produkt führte, wurden in Einzelfällen verschiedene Restriktionsenzyme für den Verdau eingesetzt und zwei unterschiedliche Primerpaare für die Amplifikation verwendet. Nachdem die Stelle der

Insertion durch Sequenzierung ermittelt wurde, wurden Primer, die das betroffene Gen flankierten, zur Verifizierung der Tn5-Insertionsstelle eingesetzt. Dabei zeigte eine Zunahme der Bandengröße um ca. 1,2 kb (entspricht der Größe von Tn5) die Insertion des Transposons im jeweiligen Gen an.

#### 3.1.2.1 Zusammenstellung der identifizierten Gene ausgewählter Tn5-Mutanten

Bei einer Auswahl von Mutanten der Stämme *L. pneumophila* JR32 und Corby, die im Agarplatten-*Screening*-Verfahren verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp ein deutlich abweichendes Hämolyseverhalten zeigten, wurden mit Hilfe von inverser PCR und Sequenzierung die Genloci der Transposoninsertion ermittelt. Die betroffenen Gene sowie deren Proteinprodukte und eine Zusammenfassung der lytischen Aktivität sind für den Stamm Corby in Tabelle 3.2 und für den Stamm JR32 in Tabelle 3.3 aufgeführt.



**Tabelle 3.2: Übersicht der mittels inverser PCR und Sequenzierung identifizierten Transposon-Insertionsorte ausgewählter Mutanten von *L. pneumophila* Corby und Zusammenfassung der im Agarplattentest ermittelten lytischen Aktivität.** Die lytische Aktivität der Mutanten wurde verglichen zum Wildtyp folgendermaßen bewertet: verringerte Aktivität (-), erhöhte Aktivität (+), gleiche Aktivität (=), kein Wachstum (k. W.), nicht auswertbar (n. a.), Insertionsstelle nicht exakt ermittelt (-), Dot/Icm-System (T4BSS) sekretierter Effektor (\*). Grau unterlegte Mutanten fielen durch eine besonders hohe Abweichung der hämolytischen Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf und wurden deshalb für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

Mutante	Häm.	Lip.	Pro.	Genort lpc	Genort lpg	Insertionsstelle	Transkriptions-einheit <sup>1</sup>	Protein
I F6	-	=	=	0979	1557	1053201 (Genmitte)	Operon mit lpc0978	<i>para</i> -aminobenzoate synthase, component I PabB
II B2	-	-	-	2877	0467	-	monocistronisch	zinc metalloprotease ProA
X C9	-	=	=	1957	2513	-	Operon mit lpc1956 und lpc1958	RND multidrug efflux membran fusion protein
XVI G1	-	-	=	1457	1970	2327341 (Genende)	Operon mit lpc1458	glutathione S-transferase Gst
XVII E5	+	=	=	1023	1596	1095211 (Genanfang)	Operon mit lpc1022 und lpc1024	enoyl CoA hydratase
XVII G5	+	=	=	1670	2205	2606639 (Genende)	monocistronisch	hypothetical protein (no homologs)
XVIII C5	-	=	k. W.	2057	2416	2914170 (Genende)	monocistronisch	ankyrin repeat-containing protein LegA1* (94)
XVIII A9	+	=	k. W.	0088	1005	85469 (Genende)	Operon mit lpc0087	LvrA
XVIII F12	+	=	=	3104	2817	3358231 (Genmitte)	monocistronisch	heat shock protein 33 Hsp33
XIX F12	-	=	=	2095	-	2873950 (Genende)	Operon mit lpc2096	hypothetical protein (Homologie zu KefB superfamily proteins, sodium/hydrogen exchanger)
XIX H12	-	=	=	0310	0235	332010 (Genende)	monocistronisch	hypothetical protein (no homologs)

<sup>1</sup> <http://linux1.softberry.com/berry.phtml/FGENESB>

Mutante	Häm.	Lip.	Pro.	Genort lpc	Genort lpg	Insertionsstelle	Transkriptions- einheit <sup>1</sup>	Protein
XXI G7	+	n. a.	=	0337	-	363340 (Genmitte)	monocistronisch	hypothetical protein (conserved hypothetical protein in <i>Streptomyces sp.</i> Mg1)
XXI H10	+	n. a.	=	1174	1733	2014168 (Genende)	monocistronisch	chloride channel protein EriC (voltage gated)
XXIII A9	+	n. a.	=	0069	-	68739 (Genanfang)	monocistronisch	hypothetical protein (similarity to transposases in different species)
XXIII H10	-	n. a.	=	3266	2951	3517495 (Genende)	monocistronisch	cystathionine <i>beta</i> synthase CysK

**Tabelle 3.3: Übersicht der mittels inverser PCR und Sequenzierung ermittelten Transposon-Insertionsorte ausgewählter Mutanten von *L. pneumophila* JR32 und Zusammenfassung der im Agarplattentest ermittelten lytischen Aktivität.** Die lytische Aktivität der Mutanten wurde verglichen zum Wildtyp folgendermaßen bewertet: verringerte Aktivität (-), erhöhte Aktivität (+), gleiche Aktivität (=), kein Wachstum (k. W.), nicht auswertbar (n. a.), Insertionsstelle nicht exakt ermittelt (-), Dot/Icm-System (T4BSS) sekretierter Effektor (\*). Die grau unterlegte Mutante XXIII A5 fiel durch eine besonders hohe Abweichung der hämolytischen Aktivität gegenüber dem Wildtyp auf und wurde deshalb für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

Mutante	Häm.	Lip.	Pro.	Genort lpg	Insertionsstelle	Transkriptions- einheit <sup>1</sup>	Protein
IV G11	-	=	n.a.	1381	1529351 (Genanfang)	Operon mit lpg1382	aldehyde dehydrogenase ALDH
XX C7	-	-	=	1529	1692531 (Genanfang)	Operon mit lpg1530	2-methylcitrate dehydratase
XXIII F2	-	=	=	1366	-	Operon mit lpg1367	hypothetical protein (member of the DUF328 superfamily, functionally uncharacterized but present in many species)
XXIII A5	+	=	=	2303	2605121 (Genmitte)	Operon mit lpg2302 und lpg2304	chorismate synthase AroC

<sup>1</sup> <http://linux1.softberry.com/berry.phtml/FGENESB>

Mutante	Häm.	Lip.	Pro.	Genort lpg	Insertionsstelle	Transkriptions- einheit <sup>1</sup>	Protein
XXIV G11	-	=	=	0288	342912 (Genende)	monocistronisch	L-lysine 2,3-aminomutase, radical SAM protein
XXV B6	-	=	n.a.	0644	687087 (Genmitte)	Operon mit lpg0645	hypothetical protein ( ~ 50% homolog of RtxA in <i>L. pneumophila</i> Paris and Lens; RtxA <i>Aeromonas hydrophila</i> ; hemolysin-type calcium-binding protein in <i>Desulfomicrobium baculatum</i> ; type I secretion target ggxgdx repeat domain protein; Ca <sup>2+</sup> -binding protein <i>Vibrio cholerae</i> ; autotransporter adhesin <i>Vibrio sp.</i> )
XXVI G5	-	n.a.	=	2885	3265981 (Genmitte)	Operon mit lpg2886	hypothetical protein (homology to magnesium and cobalt efflux protein in <i>Fusobacterium mortiferum</i> ; ABC transporter, permease protein <i>B. cereus</i> ; hypothetical protein in <i>L. monocytogenes</i> ) <sup>*</sup> (94)
XXVI H6	+	n.a.	=	0105	120445 (Genmitte)	monocistronisch	cytochrome oxidase-like protein
XXVII H4	-	n.a.	=	1200	1329239 (Genende)	Operon mit lpg1199	HisG ATP phosphoribosyltransferase
XXVII C5	+	n.a.	=	2501	2819102 (Genmitte)	monocistronisch	multidrug resistance protein D
XXVII F12	+	n.a.	=	0281	335265 (Genmitte)	monocistronisch	amino acid transporter

<sup>1</sup> <http://linux1.softberry.com/berry.phtml/FGENESB>

Die Transposoninsertionsstellen sind bei beiden Stämmen über das gesamte Genom verteilt, d. h. es waren keine Präferenzen für eine bestimmte genomische Region feststellbar. Neben einigen Genen für hypothetische Proteine waren metabolische bzw. Metabolismus-assoziierte Gene, regulatorische Gene und Virulenz-assoziierte Gene von einer Transposoninsertion betroffen. Beim Stamm Corby waren in diesem Zusammenhang z. B. die Metabolismus-assoziierten Gene *lpc1023*, codierend für die Enoyl-CoA Hydratase, die beim Abbau von Fettsäure-Acyl-CoA während der  $\beta$ -Oxidation beteiligt ist (211) und *lpc3266*, codierend für eine Cystathionin *beta*-Synthase, ein Pyridoxal-Phosphat-abhängiges Enzym mit einer Häm-Gruppe, das die Kondensation von Serin und Homocystein zu Cystathionin katalysiert, betroffen (211). Des Weiteren wurde eine Transposoninsertion im Gen für LvrA (*Legionella virulence* region), das auf einer DNA-Insel innerhalb des *Legionella*-Genoms, die einen höheren GC-Gehalt im Vergleich zum Rest des Chromosoms besitzt, zwischen *lvh* (*Legionella vir* homologues)-Genen lokalisiert ist, identifiziert (121). Diese Gene codieren für das Lvh-Typ IV Sekretionssystem, das für die intrazelluläre Vermehrung in *A. castellanii* als entbehrlich eingestuft wurde, aber möglicherweise Komponenten des Dot/Icm-Systems ersetzt (121) und in den Prozess der bakteriellen Konjugation involviert ist (212). Auch das während des Screenings identifizierte Ankyrin repeat-containing Protein LegA1, das über das Dot/Icm T4BSS sekretiert wird (94), könnte ein Virulenz-assoziiertes Faktor sein, da bakterielle Proteine mit Ankyrin-repeat Homologie-Domänen in *L. pneumophila* und auch *Coxiella burnettii* über das Typ IV-Sekretionssystem in die eukaryotische Wirtszelle sezerniert werden um dort Wirtsfunktionen durch molekulare Mimickry zu beeinflussen oder die Funktion eukaryotischer Effektoren zu stören (213). Die ursprüngliche Intention der Arbeit, mit diesem Screening-System mögliche noch unbekannte Phospholipasen zu entdecken, wurde jedoch nicht erfüllt.

Für den Stamm *L. pneumophila* JR32 wurden im Zusammenhang mit diesem Screen ebenfalls Transposoninsertionsorte in Metabolismus-assoziierten Genen identifiziert. Ein Beispiel dafür ist die Aldehyd-Dehydrogenase, ein Enzym das die im Intermediärmetabolismus generierten toxischen Aldehyde beim Abbau von Ethanol über Azetaldehyd zu Azetat oxidiert. Ebenso wie für den Stamm Corby wurde auch für JR32 ein Gen identifiziert, das im erweiterten Sinne eine wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus spielt. Die Methylcitrat-Dehydratase PrpD stellt ein Enzym des Methylcitrat-Zyklus dar, der essentiell für den Propionat-Metabolismus in *Mycobacterium tuberculosis* ist (214). Propionyl-CoA fällt wiederum bei der  $\beta$ -Oxidation von ungeraden Fettsäurekettenlängen als zusätzliches Produkt an und wird u. a. im Rahmen

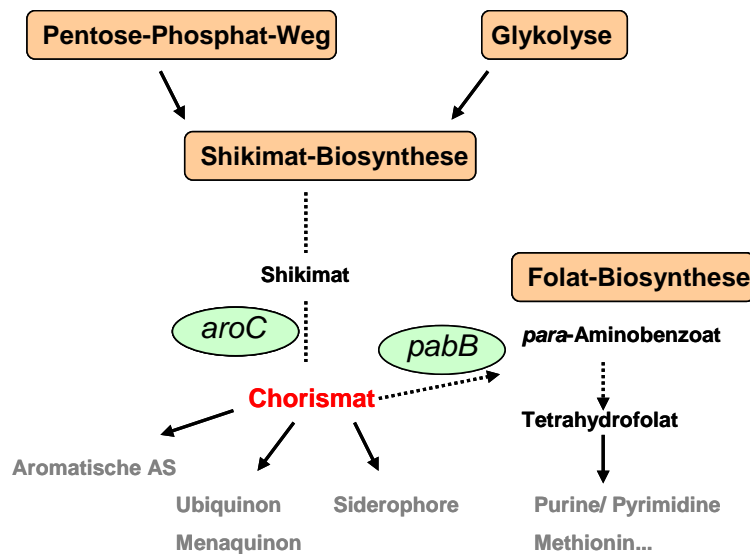
des Methylcitrat-Zyklus zu Pyruvat oxidiert (215, 216). Interessant war auch die Tn5-Insertion im Gen lpg0645 einer hämolytisch-vermindert aktiven Mutante. Dieses konservierte Gen codiert für ein hypothetisches Protein, bei dem es sich laut NCBI um ein verkürztes RtxA-Protein handeln könnte. RtxA wurde bereits im Rahmen eines *Screenings* auf Mutanten, die den Phänotyp eines verstärkten Eintritts in die Wirtszelle zeigten, gefunden (52). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Zhu und Mitarbeitern, die eine umfassende Identifizierung von Dot/Icm-System sekretierten *L. pneumophila* Effektoren beinhaltet, führt das Gen lpg2885, das beim *Screening* der *L. pneumophila* JR32 Tn5-Insertionsmutantenklonbank aufgrund eines verminderten Hämolysephänotyps identifiziert wurde, als für einen ebensolchen Effektor codierend an (94). Es handelt sich um ein hypothetisches Protein, das Homologie zu ABC-Transporterproteinen besitzt und ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellt.

Während des *Screening*-Prozesses der Corby-Klonbank wurde eine Mutante mit einer Transposoninsertion im *proA*-Gen identifiziert, dessen Genprodukt, die Typ II-sekretierte Zink-Metalloprotease ProA, eine der hauptsächlich sekretierten Proteasen von *L. pneumophila* darstellt, die vermutlich eine Funktion bei der Gewinnung von Nährstoffen besitzt, aber auch die bakterielle Phospholipase PlaC aktiviert und damit einen post-transkriptionellen Aktivator darstellt, also ein Beispiel für ein regulatorisch wirkendes Protein ist (112). Die entsprechende Mutante II B2 wurde als Kontrolle in weiterführenden Experimenten zur Beurteilung der hämolytischen Aktivität mitgeführt, da sie auf den Agarplatten keine hämolytische Aktivität zeigte und für die Einschätzung der Mutante I F6, die auf Humanblutagar verminderte hämolytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zeigte, hilfreich war. Diese Mutante besitzt eine Tn5-Insertion im *pabB*-Gen (lpc0979), das für die *para*-Aminobenzoatsynthase codiert, und wurde neben der Mutante XVIII F12 mit einer Tn5-Insertion im *yrfI*-Gen (lpc3104) für eine weitergehende Charakterisierung ausgewählt, da beide in ihrer hämolytischen Aktivität am meisten vom Wildtyp abwichen. Dazu wurde zusätzlich noch die Mutante XXIII A5 mit einer Tn5-Insertion im *aroC*-Gen (lpg2303) des Stammes JR32 ausgewählt. Diese Mutanten besitzen Insertionen in Genen, die bisher noch nicht näher charakterisiert wurden und für die weiterhin noch keine mögliche Assoziation zur Virulenz von *L. pneumophila* hergestellt wurde. Außerdem stellen speziell metabolische oder Metabolismus-assoziierte Proteine einen interessanten Forschungsaspekt dar, da vor allem intrazelluläre Pathogene wie *L. pneumophila* während ihres Infektionszykluses auf eine adäquate Nährstoffzufuhr angewiesen sind und das komplexe Zusammenspiel zwischen Metabolismus und Virulenz dabei eine

entscheidende Rolle spielen könnte. Diese Mutanten wurden deshalb weiterführend mit besonderem Fokus auf ihr hämolytisches Potential in einem Flüssighämolyseexperiment beurteilt.

### 3.1.3 Weiterführende Charakterisierung der hämolytischen Aktivität ausgewählter Mutanten

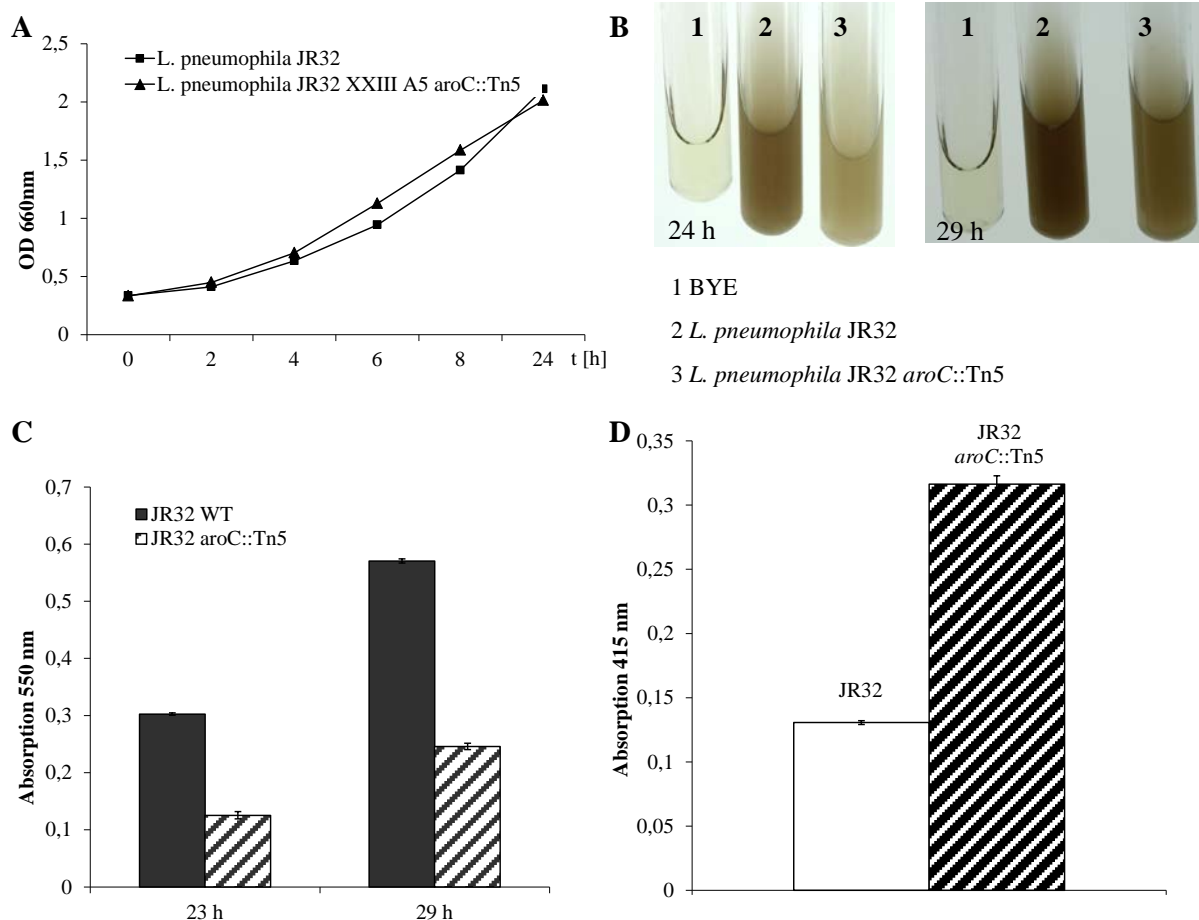
Um das hämolytische Potential der auffälligen Mutanten besser einschätzen zu können, wurde ein Flüssighämolysetest nach Kirby und Mitarbeitern durchgeführt (69). Die JR32 Mutante XXIII A5 besitzt eine Tn5-Insertion im *aroC*-Gen (lpg2303), das für die Chorismatsynthase codiert, ein im Shikimat-Syntheseweg involviertes Enzym für die Synthese von Chorismat, das wiederum ein Vorläufermolekül für die Generierung aromatischer Aminosäuren, *para*-Aminobenzoat (Folatbiosynthese) und weiterer Produkte für die Synthese von Siderophoren, Ubiquinonen und Menaquinonen darstellt (s. Abbildung 3.3) (217).



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Verknüpfung des Shikimat- und Folat-Biosyntheseweges mit Chorismat als zentralem Präkursor. Die Enzyme Chorismatsynthase (codiert durch *aroC*) und *para*-Aminobenzoatsynthase (codiert durch *pabB*), sind bei der Bildung bzw. bei der weiteren Umsetzung von Chorismat beteiligt.

Eine Untersuchung des Wachstumsverhalten der JR32-Mutante XXIII A5 (*aroC*::Tn5) in BYE-Flüssigmedium zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinerlei Unterschiede, d. h. die Transposoninsertion wirkte sich offensichtlich nicht auf das Wachstum der Mutante aus (s. Abbildung 3.4). Auffällig war allerdings, dass die Mutante eine deutlich verringerte

Pigmentbildung aufwies. Eine Bestimmung der Pigmentproduktion durch Messen der Absorption bei 550 nm (218) zeigte, dass die Mutante JR32 XXIII A5 (*aroC*::Tn5) verglichen mit dem Wildtyp um mehr als die Hälfte in ihrer Pigmentbildung reduziert war (s. Abbildung 3.4). Das sogenannte „*Browning*“ der *Legionella*-Kulturen ist im Wesentlichen auf die Bildung von Legiolysin (Lly) zurück zu führen, ein Protein, das an der Synthese eines melaninartigen Pigments beteiligt ist (219). Im Flüssighämolysetest wies die *aroC*-Mutante dagegen eine mehr als doppelt so hohe hämolytische Aktivität verglichen mit dem Wildtyp auf (s. Abbildung 3.4).



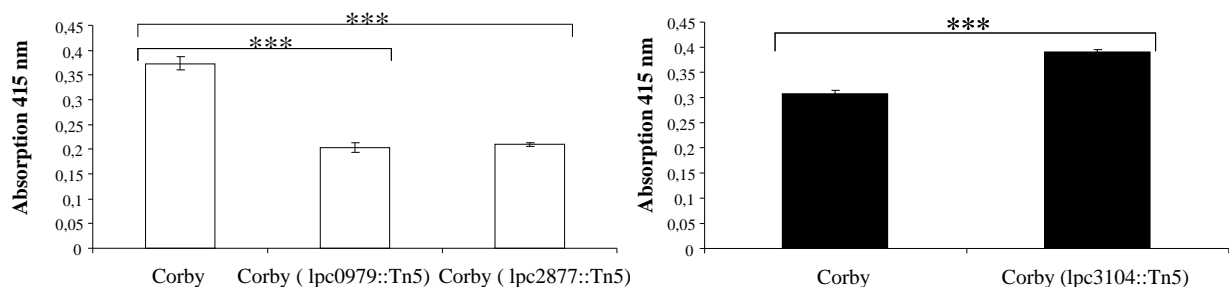
**Abbildung 3.4: Wachstumskurve, Vergleich der Legiolysinbildung und Flüssighämolysetest der *Legionella*-Mutante JR32 XXIII A5 (*aroC*::Tn5) im Vergleich zum Wildtyp (WT).** A) Es konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten der Mutante verglichen mit dem Wildtyp festgestellt werden. (n=2, 2 Wiederholungen) B) Ein optischer Vergleich der Legiolysinbildung (Braunfärbung) zeigt eine deutlich verminderte Braunfärbung im Falle der Mutante verglichen mit dem Wildtyp. C) Die Pigmentproduktion beider Stämme wurde durch Messen der Absorption bei 550 nm bestimmt (218). Die Mutante JR32 XXIII A5 (*aroC*::Tn5) war verglichen mit dem Wildtyp um mehr als die Hälfte in ihrer Pigmentbildung reduziert (n=2, 2 Wiederholungen). D) Im Flüssighämolysetest zeigte die *Legionella*-Mutante JR32 XXIII A5 (*aroC*::Tn5) eine ca. doppelt so hohe hämolytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Legionellen wurden jeweils in

Dreifachansätzen (n=3, 2 Wiederholungen) für 2,5 h mit humanen Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 415 nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) gemessen.

Durch Einbringen des durch die Insertion betroffenen Gens der Chorismatsynthase *aroC* auf einem Plasmidvektor (pBCKS) und Expression in der *L. pneumophila* JR32 Mutante XXIII A5 wurde eine Wiederherstellung der hämolytischen Aktivität auf das Niveau des Wildtyps weder auf Humanblutagarplatten noch im Flüssighämolysetest erreicht (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte die hämolytische Aktivität des JR32 Wildtyps im Flüssighämolysetest nicht als stabil eingeschätzt werden, weshalb sich der Fokus der weiteren Arbeiten auf Mutanten des Stammes Corby richtete.

Für eine weitergehende Charakterisierung des hämolytischen Verhaltens mittels Flüssighämolysetests wurden aus dem „Pool“ der Mutanten mit verändertem hämolytischen Potential des Stammes *L. pneumophila* Corby, eine Mutante, die in ihrem Hämolyseverhalten im Vergleich zum Wildtyp am stärksten vermindert war (I F6) und eine Mutante, die in dieser Hinsicht am stärksten erhöht war (XVIII F12), ausgewählt. Die hämolytische Aktivität der Mutante XVIII F12, die eine Tn5-Insertion im Gen *yrfl* (*lpc3104*), das für das Hitzeschockprotein 33 codiert, trägt, war gegenüber dem Wildtyp um ca. ein Viertel erhöht (s. Abbildung 3.5).

Wie aus Abbildung 3.5 ersichtlich ist, besaß die Mutante I F6 mit der Transposoninsertion im Gen *lpc0979*, das für die *para*-Aminobenzoatsynthase PabB codiert, verglichen mit dem Wildtyp eine um die Hälfte reduzierte hämolytische Aktivität, die ungefähr auf dem Niveau der Mutante II B2 (Tn5-Insertion im Gen der Zink-Metalloprotease ProA (*lpc2877*)) lag.



**Abbildung 3.5:** Flüssighämolysetest mit *L. pneumophila* Corby und den Mutanten Corby I F6 (*pabB*::Tn5), Transposoninsertion im *pabB*-Gen (*lpc0979*), II B2 (*proA*::Tn5), Transposoninsertion im *proA*-Gen (*lpc2877*), und XVIII F12 (*yrfl*::Tn5), Transposoninsertion im *yrfl*-Gen (*lpc3104*). Die Legionellen wurden jeweils in Dreifachansätzen (n=3, 3 Wiederholungen mit ähnlichen Resultaten) für 2,5 h mit

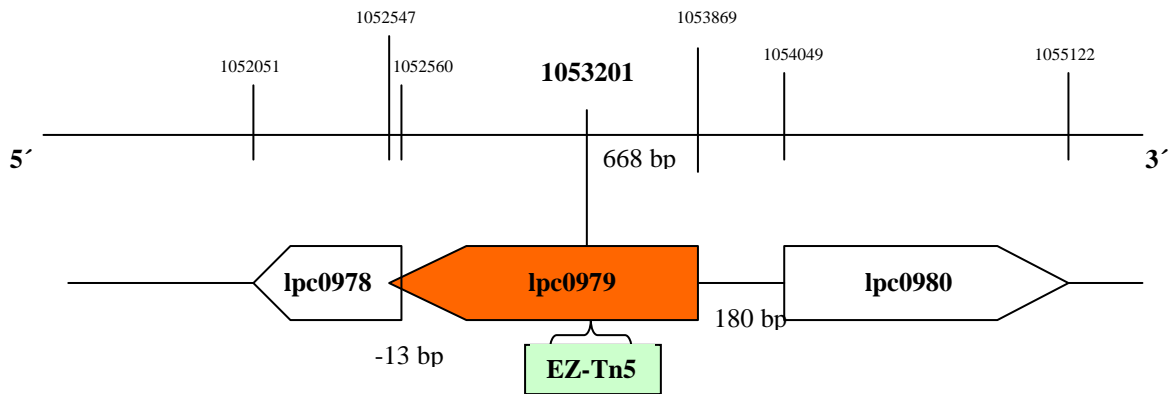


humanen Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 415 nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) gemessen. ( $P < 0,001$  \*\*\*; Student's T-Test)

Das *pabB*-Gen in *E. coli* codiert für eine Untereinheit der *para*-Aminobenzoatsynthase (PABS), die den ersten Reaktionsschritt der Konversion von Chorismat über ein Zwischenprodukt zu *para*-Aminobenzoat (PABA) katalysiert (220). PABA ist ein essentielles Vorläufermolekül für die Biosynthese von Dihydrofolat, das wiederum an der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Formylmethionyl-t-RNA und einigen Aminosäuren und Vitaminen beteiligt ist (s. Abbildung 3.3) (221). Sowohl das Gen für die *para*-Aminobenzoatsynthase der Corby Mutante I F6, als auch das Gen für das Hitzeschockprotein Hsp 33 der Mutante XVIII F12 wurden in den Plasmidvektor pBCKS eingebracht und in den Mutanten erfolgreich exprimiert (Nachweis durch RT-PCR, Daten nicht gezeigt). Mit dieser Strategie konnte jedoch sowohl im Flüssighämolyseassay als auch auf den *Legionella*-Humanblutagarplatten keine Wiederherstellung der hämolytischen Aktivität auf das Niveau des Wildtyps erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Da die Mutante I F6 den stärksten Phänotyp hinsichtlich eines veränderten Hämolyseverhaltens zeigte, wurde für diese Mutante noch eine andere Komplementationsstrategie verfolgt.

#### 3.1.4 Charakterisierung einer Hämolyse-verminderten Mutante mit Insertionsort im Genlokus *lpc0979* (*pabB::Tn5* Mutante)

Durch Sequenzierung des in der inversen PCR erhaltenen PCR-Produktes konnte in der *L. pneumophila* Corby Mutante I F6 die exakte Insertionsstelle des Transposons in der Mitte des Gens *lpc0979*, das für die *para*-Aminobenzoatsynthase PabB codiert, lokalisiert werden. Dieses Gen überlappt sich um 13 bp mit *lpc0978*, das für ein MutT/nudix family protein codiert, ein Protein das Homologie zur Coenzym-A Pyrophosphatase (CoAse) besitzt, welches zur Nudix Hydrolase-Superfamilie gehört (222) (s. Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Genomischer Hintergrund des Gens *lpc0979* in *L. pneumophila* Corby und Darstellung der Transposon-Insertionsstelle in der Mutante *pabB*::Tn5.** Es wurden jeweils Genanfang und Genende der Loci *lpc0978*, *lpc0979* und *lpc0980* dargestellt, sowie die Insertionsstelle des Transposons (fett markiert) in der Mitte von *lpc0979*.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die Transkription des Gens *lpc0979* (*pabB*) in der Mutante beeinflusst ist, wurde das in gleicher Orientierung liegende, benachbarte Gen *lpc0978* hinsichtlich dessen Expression mittels RT-PCR untersucht. Aus Abbildung 3.7 ist ersichtlich, dass die *pabB*::Tn5 Mutante nicht mehr in der Lage ist, *lpc0979* zu exprimieren. Dagegen hat die Transposoninsertion auf das in gleicher Orientierung liegende Gen *lpc0978* offensichtlich keinen Einfluss im Hinblick auf dessen Expression, denn mittels RT-PCR konnte eine deutliche Bande detektiert werden.

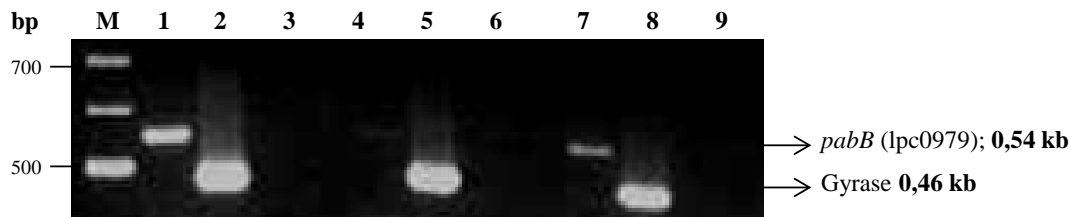


**Abbildung 3.7: Reverse Transkriptase-PCR zur Überprüfung der Genexpression von *lpc0978* und *lpc0979* in der Mutante *L. pneumophila* Corby *pabB*::Tn5 und dem Wildtyp.** Spuren: M: DNA-Marker, 1-4: Mutante *pabB*::Tn5; 5-8: Corby Wildtyp; 1/ 5: *lpc0979*, 2/ 6: *lpc0978*, 3/ 7: Gyrase-Positivkontrolle, 4/ 8: Gyrase-Negativkontrolle. Die DNA Gyrase diente als Positivkontrolle, da diese konstitutiv exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurde RNA eingesetzt, die den Schritt der reversen Transkription übergangen hat (3 Wiederholungen).

Da durch die Transposoninsertion ausschließlich das Gen *lpc0979* direkt betroffen war, wurde nur dieses Gen komplementiert.

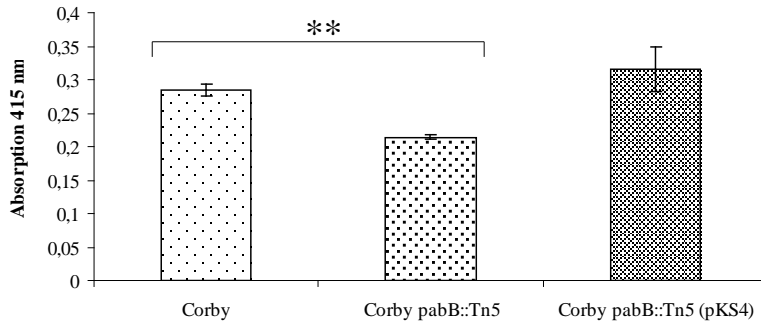
#### 3.1.4.1 Komplementation der *pabB*::Tn5 Mutante und Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Da die Komplementation von *lpc0979* über den Plasmidvektor pBCKS nicht zum Erfolg geführt hatte, d. h. keine Wiederherstellung der hämolytischen Aktivität auf das Niveau des Wildtyps möglich war, wurde über eine alternative Komplementationsstrategie versucht, das Wildtypgen wieder in das Chromosom der Mutante zu reintegrieren. Dazu wurde der Vektor pLAW344, der von H. Shuman (New York, USA) zur Verfügung gestellt wurde, genutzt (218). Dieser Vektor wird in *L. pneumophila* nicht repliziert, integriert jedoch durch homologe Rekombination ins Chromosom. Rekombinierte Klone können anschließend auf Sukroseresistenz selektiert werden, da das Plasmid das *sacB*-Gen trägt. Durch diese Strategie konnte das Gen *lpc0979* erfolgreich wieder in die Mutante integriert und exprimiert werden (s. Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Reverse Transkriptase-PCR zur Überprüfung der Genexpression von *lpc0979* in der Komplementante *L. pneumophila* Corby *pabB*::Tn5 (pKS4).** Spuren: M: DNA-Marker, 1-3: Corby Wildtyp; 4-6: Mutante *pabB*::Tn5; 7-9: Corby *pabB*::Tn5 (pKS4) 1/ 4/ 7: *lpc0979*, 2/ 5/ 8: Gyrase-Positivkontrolle, 3/ 6/ 9: Gyrase-Negativkontrolle. Die DNA Gyrase diente als Positivkontrolle, da diese konstitutiv exprimiert wird. Als Negativkontrolle wurde RNA eingesetzt, die den Schritt der reversen Transkription übergangen hat (2 Wiederholungen).

Nachdem die Expression des *pabB*-Gens in der Mutante wiederhergestellt wurde, wurde die Komplementante hinsichtlich ihres Hämolysephänotyps im Flüssighämolysetest untersucht. Dieses Experiment konnte belegen, dass die komplementierte Mutante wieder in der Lage war, rote Blutkörperchen dem Wildtypniveau entsprechend zu lysieren (s. Abbildung 3.9).

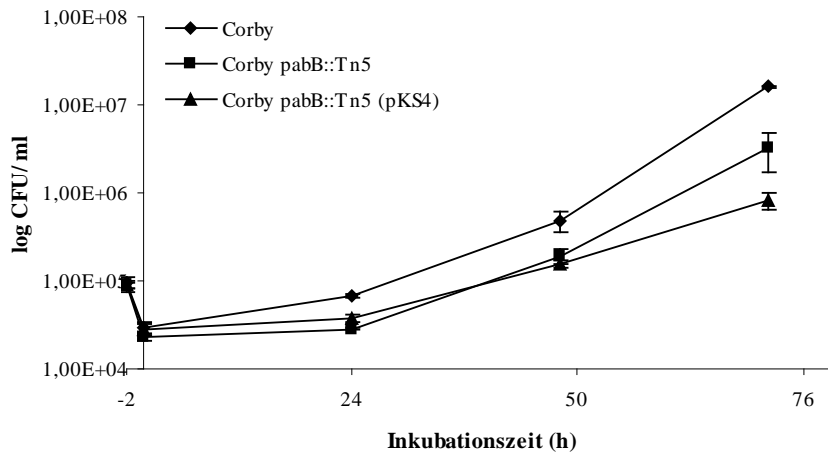


**Abbildung 3.9: Flüssighämolysetest mit *L. pneumophila* Corby, der Mutante Corby *pabB*::Tn5 und der Komplementante Corby *pabB*::Tn5 (pKS4).** Die Legionellen wurden jeweils in Dreifachansätzen (n=3; 3 Wiederholungen mit ähnlichen Resultaten) für 2,5 h mit humanen Erythrozyten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 415 nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) gemessen. ( $P < 0,01$  \*\*; Student's T-Test)

Da nun eine Komplementante zur Verfügung stand, die den Phänotyp der reduzierten Hämolyse wiederherstellen konnte, sollte das Virulenzpotential der *Legionella*-Mutante *pabB*::Tn5 auch im *in vitro* Modellsystem einer Amöbeninfektion getestet werden.

#### 3.1.4.2 Untersuchung der intrazellulären Vermehrung der *pabB*::Tn5 Mutante in *Acanthamoeba castellanii*

Um zu prüfen, ob die Corby *pabB*::Tn5 Mutante in der Lage ist, sich in Wirtszellen zu replizieren, wurde diese Mutante und im Vergleich dazu auch der Corby Wildtyp sowie die Komplementante Corby *pabB*::Tn5 (pKS4) in einer Koinfektion mit *Acanthamoeba castellanii* auf deren intrazelluläre Vermehrung getestet. Nach einer Infektionsdauer von 72 h zeigte die Mutante eine um das fünf-fache reduzierte Vermehrung verglichen mit dem Wildtyp (s. Abbildung 3.10). In der Infektion von *A. castellanii* konnte der Replikationsdefiziente Phänotyp allerdings nicht komplementiert werden. Bei einer MOI von 0,1 war die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit der Komplementante nach 72 h sogar noch schwächer, als die der Mutante. Setzt man eine MOI von 1 ein, dann erreicht die Komplementante bei der Bildung von CFU annähernd das Niveau der Mutante (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der in Abbildung 3.10 dargestellten Komplementante, wurde noch eine weitere Komplementante getestet (Daten nicht gezeigt), da möglicherweise auch *Second Site*-Mutationen eine Rolle spielen könnten. Allerdings konnte auch mit dieser zweiten Komplementante der Replikations-defiziente Phänotyp nicht komplementiert werden.



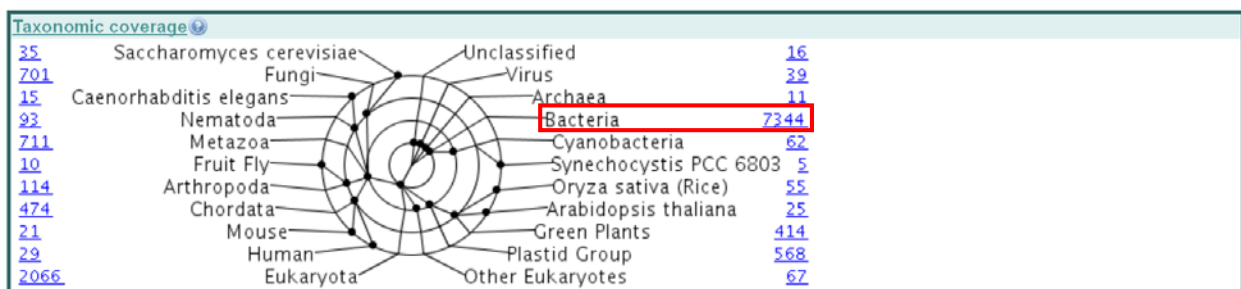
**Abbildung 3.10:** Koinfektion der *Legionella*-Stämme Corby, der Mutante Corby *pabB*::Tn5 und der Komplementante Corby *pabB*::Tn5 (pKS4) mit *Acanthamoeba castellanii*. *A. castellanii* wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die intrazelluläre Vermehrungsrate wurde durch CFU-Zählung nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ermittelt. Die Daten repräsentieren Duplikate von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da durch die Reintegration des intakten *pabB*-Gens für die Synthese des Proteins *para*-Aminobenzoatsynthase nur der Phänotyp einer reduzierten hämolytischen Aktivität komplementiert werden konnte, nicht jedoch die reduzierte intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in *A. castellanii*, wurde der Fokus der zukünftigen Arbeiten auf ein weiteres hämolytisch aktives *Legionella*-Protein gelegt. Aufgrund der ursprünglichen Intention der Arbeit, die Entdeckung möglicher noch unbekannter Phospholipasen durch ein Agarplatten-basiertes *Screening* auf lytische Aktivitäten, wurde für den weiteren Verlauf der Arbeit festgelegt, die Phospholipase VipD/PatA aus der Gruppe der Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) zu charakterisieren.

### 3.2 Charakterisierung von PatA – ein hämolytisch wirkendes, Patatin-ähnliches Protein von *L. pneumophila*

Die Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) stellen neben den GDSL-Hydrolasen und der zellassoziierten Phospholipase PlaB eine dritte Gruppe von Phospholipasen A bei *L. pneumophila* dar (167). Proteine mit Patatindomänen können in allen taxonomischen Reichen gefunden werden, das Reich der Bakterien beinhaltet jedoch mit über 7300 Proteinen die größte Anzahl (s. Abbildung 3.11). Innerhalb der Bakterien besitzen insbesondere die Genome pathogener, sich intrazellulär vermehrender, oder symbiontischer Mikroorganismen eine Vielzahl an Genen, die für PLP codieren (167). Durch gezielte Suche nach *L.*

*pneumophila*-Genen, die nach Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Veränderungen des Vesikeltrafficking hervorriefen, wurden die Typ IVB-Effektoren VipA, VipD und VipF gefunden. Dadurch existiert für PatA noch die alternative Bezeichnung VipD (Vip, VPS (Vacuole protein sorting) inhibitor protein) (166). Drei weitere zu PatA/VipD homologe PLP (PatC/VpdA, PatF/VpdC, PatG/VpdB) wurden ebenfalls beschrieben. Diese werden auch abhängig vom Typ IVB-Sekretionssystem transloziert (94, 177) und enthalten neben der Patatindomäne zusätzliche Proteinbereiche, die vorrangig die C-Termini betreffen und keine Homologie zu bekannten Proteinen zeigen.



**Abbildung 3.11: Vorkommen Patatin-ähnlicher Proteine (PLP) in verschiedenen taxonomischen Reichen.**

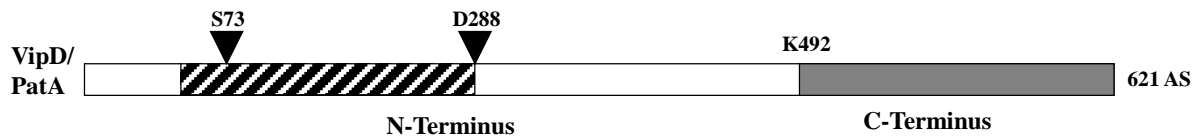
Innerhalb der sequenzierten bakteriellen Genome existieren mehr als 7300 für PLP codierende Gene (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>; Suchstrategie: Eingabe des Stichwortes „patatin“). Stand: Juli 2012

Obleich Gene für PLP in Bakterien weit verbreitet sind, wurden diese experimentell noch nicht umfassend untersucht. Eine Ausnahme bildet die Typ III-sekretierte Phospholipase A ExoU von *P. aeruginosa*, die eine Patatindomäne besitzt und als potentes, sekretiertes Zytotoxin beschrieben wurde (178, 188, 190, 223-226). Da PatA/VipD die höchste Sequenzhomologie der *Legionella* PLP zu ExoU aufweist und das *patA*-Gen (lpg2831) während einer Infektion verstärkt exprimiert wird, woraus sich eine bedeutsame Rolle dieser Phospholipase für die Pathogenese und Virulenz von *L. pneumophila* vermuten lässt, wurde PatA/VipD für eine umfassendere Charakterisierung ausgewählt.

### 3.2.1 In silico Analyse von *L. pneumophila* PatA

Die Phospholipase PatA/VipD ist eines der 11 in *L. pneumophila* vorkommenden Patatin-ähnlichen Proteine und wurde als ein Dot/Icm Typ IVB-sekretierter Effektor beschrieben (166). Das 1866 bp umfassende *patA*-Gen codiert für ein Protein mit 621 Aminosäuren, das ein Molekulargewicht von 69,3 kDa besitzt (s. Abbildung 3.12). Aufgrund seiner zu den flankierenden Genen *legU2* und *lpg2832* entgegengesetzten Orientierung, ist das *L.*

*pneumophila patA*-Gen offenbar nicht in einem Operon organisiert. Diese Vorhersage wurde auch durch das Programm „FGENESB“ getroffen<sup>1</sup>.



**Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des PatA-Proteins.** Die Patatin-Domäne (schraffiert) beinhaltet die aus den Aminosäuren Serin 73 und Aspartat 288 bestehende katalytische Diade (schwarze Dreiecke), die im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist. Der ca. 129 Aminosäuren umfassende C-terminale Bereich (grau), weist keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen auf.

Abgesehen von der im N-Terminus lokalisierten Patatin-Domäne besitzt das PatA-Protein keine weiteren konservierten Sequenzbereiche oder Domänen, die signifikante Homologien aufweisen und auch kein Signalpeptid. Dies zeigt auch ein Vergleich der Sequenzhomologien von *L. pneumophila* PatA und *P. aeruginosa* ExoU, die sich ebenfalls nur über eine Länge von ca. 300 Aminosäuren der Patatin-Domäne erstrecken. In diesem Bereich finden sich die für PLP spezifischen konservierten Proteinregionen, das Oxyanionenloch, das Serin-Hydrolase-Motiv (GX SXG-Motiv), das ein hoch konserviertes Serin enthält, ein konserviertes Prolin und ein im DXG-Motiv enthaltenes konserviertes Aspartat, das ebenfalls Bestandteil der katalytischen Diade aus Serin und Aspartat ist (s. Abbildung 3.13).

Der C-Terminus, der bei ExoU für die intrazelluläre Lokalisation des Proteins und dessen Phospholipaseaktivität und Toxizität essentiell ist (188, 195), weist dagegen zu PatA und auch zu anderen Proteinen keine signifikante Ähnlichkeit auf. In einer Arbeit von Rabin und Hauser (2005) wurden für ExoU mindestens fünf für die Zytotoxizität und Phospholipaseaktivität notwendige Proteinregionen determiniert (194). Drei dieser Regionen, das Oxyanionenloch, das Serin-Hydrolase-Motiv und das katalytisch aktive Aspartat sind homolog auch in PatA vorhanden, wohingegen die anderen beiden Proteinareale, die innerhalb der Patatin-Domäne sowie im C-Terminus lokalisiert wurden, in PatA nicht konserviert sind.

<sup>1</sup> [www.softberry.com/FGENESB](http://www.softberry.com/FGENESB)

PatA	1	-----	0
ExoU	1	MHIQSLGATASSLNQEPVETPSQAAHKSSASLRQEPSGQGLGVALKSTPGI	50
PatA	1	-----MKLAEIMTKSRKLKRNLLLEISKTEAGQYSVS	31
ExoU	51	LSGKLPESVSDVRFSSPQGQGESRTLTDSSAGPRQITLRQFENGVTQLS	100
PatA	32	APEHKGLVLSGGGAKGISYLGMIQALQERGKIKNLTHVSGASAGAMTASI	81
ExoU	101	RPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEKGMLDGIRSNISGSSAGGITAAL	150
PatA	82	LAVGMDIKDIKKLIEGLDITKLLDNS-----GVGF	111
ExoU	151	LASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLQFQHISSEIGASLKKGLGN	200
PatA	112	RARGDRFRNILDVIYMMQMKKHLESVQQPIPPPEQQMNYGILKQKIALYED	161
ExoU	201	KIGG--FSELL-----LNVLPRIIDSRAEPL-----RLLRD	229
PatA	162	KLSRAGIVINNVDIINLTKSVDLEKLDKALNSIPTLEKGAKEQLENP	211
ExoU	230	ETRKA--VLGQIATHPEVAR-----QPTVAAIASRLQSGSG-----	263
PatA	212	RLTLGDLGRRLRELLPEENKHLIKNLSVVVTN--QTKHELERYSEDTPPQQ	259
ExoU	264	-VTFGDLDRLSAYIPQ-----IKTLNITGTAMFEGRPQLVVFNASHTPDL	307
PatA	260	SIAQVVQWSGAHPVLFVPGRNAKGEYIA-----DGGILDNMPEIEGL	301
ExoU	308	EVAQAAHISGSFPGVFQKVSLSDDQPYQAGVEWTEFDGGVMINVPVPEMI	357

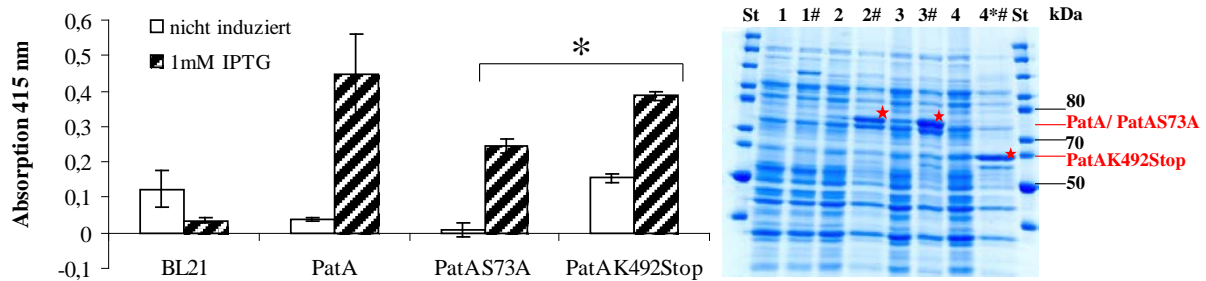
**Abbildung 3.13: Sequenzvergleich der Aminosäuren von *L. pneumophila* PatA und *P. aeruginosa* ExoU.** Dargestellt sind die ca. 300 Aminosäuren der Patatin-Domäne im N-Terminus des Proteins, die homologe Bereiche enthalten. Dies sind die für PLP spezifischen konservierten Proteinregionen: I, Oxyanionenloch, II, Serin-Hydrolase-Motiv, III, konserviertes Prolin und IV, konserviertes katalytisches Aspartat, die durch rote Boxen hervorgehoben wurden. ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_emboss\\_needle](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_emboss_needle))

### 3.2.2 Untersuchung der hämolytischen Aktivität von rekombinant exprimiertem PatA

In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass eine *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte hämolytische Aktivität besaß (196). In dieser Arbeit wurden PatA, die katalytische Mutante PatAS73A sowie eine mutierte Version von PatA, der der komplette C-Terminus des Proteins fehlt (PatAK492Stop) rekombinant in *E. coli* BL21 nach einer 3-stündigen Induktion mit 1 mM IPTG exprimiert und im Flüssighämolysetest (69) analysiert. Die Expression der Proteine wurde im SDS-PAGE Gel



kontrolliert. Wie aus Abbildung 3.14 ersichtlich ist, war der PatA exprimierende *E. coli* Stamm im Gegensatz zum BL21 Wildtyp in der Lage humane Erythrozyten zu lysieren.

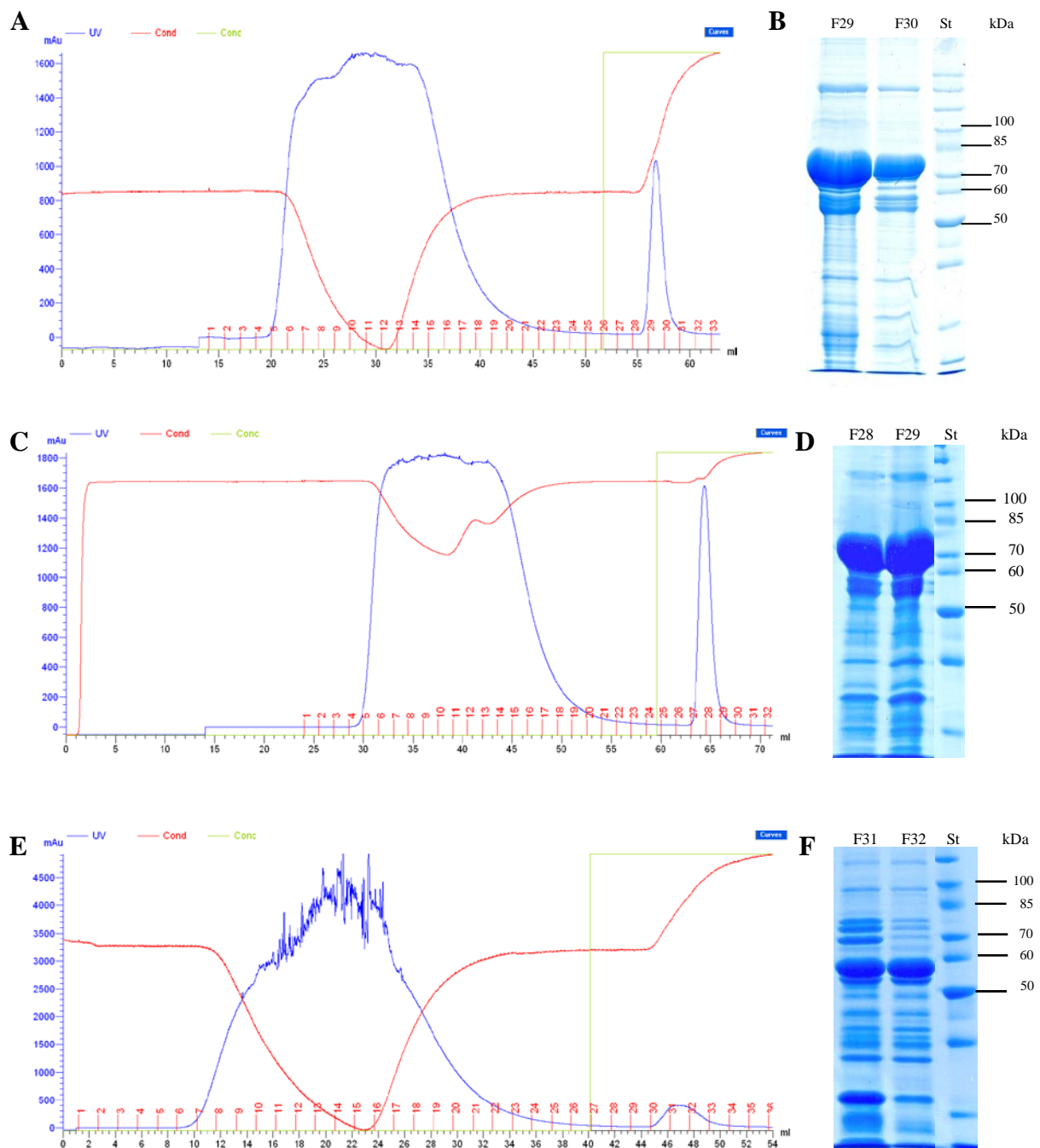


**Abbildung 3.14: Hämolytische Aktivität von PatA und PatA-Mutanten.** Humane Erythrozyten wurden in einem Flüssighämolysetest mit *E. coli* BL21 Zellen inkubiert, die His<sub>6</sub>-PatA (Plasmid: pPA12), eine Mutante, in der das katalytisch aktive Serin 73 substituiert wurde, His<sub>6</sub>-PatAS73A (pPA46), und eine Mutante ohne den C-Terminus des Proteins, His<sub>6</sub>-PatAK492Stop (pPA63) exprimierten. Die Freisetzung von Hämoglobin in den Überstand wurde nach einer Inkubationsdauer von 19 h gemessen. Die Daten stellen Doppelwerte von mindestens drei unabhängigen, repräsentativen Experimenten dar. Die Expression der Proteine wurde auf einem SDS-Gel kontrolliert. Spuren: St: Protein Standard, 1: *E. coli* BL21, 2: *E. coli* BL21 (pPA12), 3: *E. coli* BL21 (pPA46), 4: *E. coli* BL21 (pPA63), # induziert mit 1mM IPTG, (P < 0,05 \*; Student's T-Test)

Die Proteinvariante PatAS73A, bei der die katalytisch aktive Aminosäure Serin 73 durch Alanin ersetzt wurde, besaß dagegen eine um die Hälfte reduzierte hämolytische Aktivität. Dagegen hatte eine C-terminale Verkürzung des Proteins, PatAK492Stop, nur einen geringen Einfluss auf das hämolytische Potential, denn die hämolytische Aktivität war nur etwas reduziert und damit vergleichbar mit der des intakten Proteins. Der Hämolyse-Assay wurde ebenfalls mit den gereinigten Proteinvarianten (s. 3.2.3) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es war jedoch in keinem Fall eine hämolytische Aktivität der gereinigten Proteine zu verzeichnen. Auch die Zugabe von *E. coli* BL21 Zelllysat zu den gereinigten Proteinvarianten und humanen Blutzellen erbrachte keinen Nachweis einer hämolytischen Aktivität (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Untersuchung der lipolytischen Aktivität von gereinigtem PatA

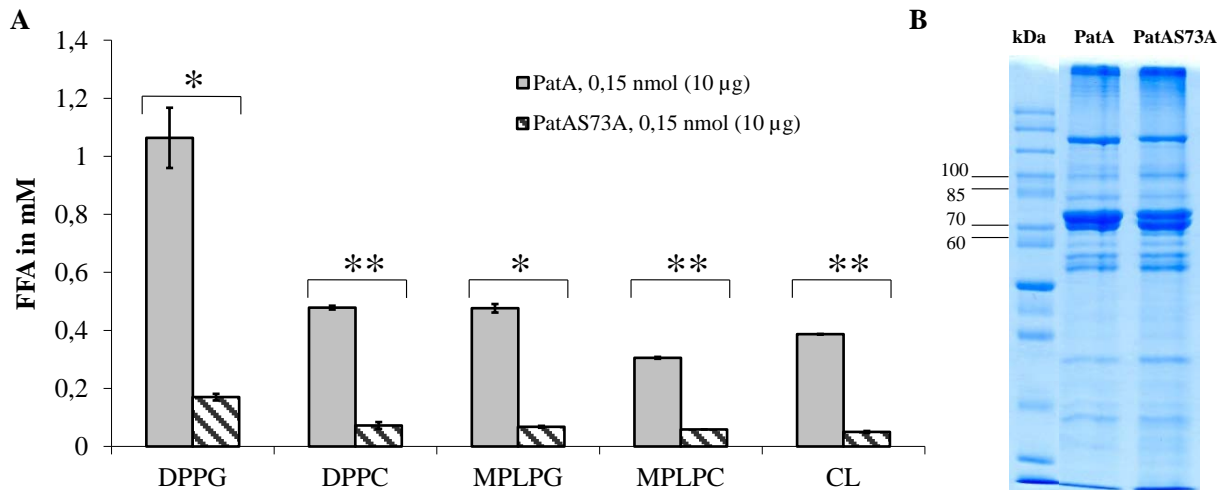
Da ein Lipidhydrolyse-Assay mit *E. coli*-Kulturen, die PatA rekombinant exprimieren, auf Grund des bakteriellen Hintergrundes keinen Aufschluss über die lipolytische Aktivität des Proteins gab, wurden PatA, PatAS73A und PatAK492Stop chromatographisch über ihren N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag gereinigt (PatA, PatAS73A und PatAK492Stop s. Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Chromatographische Reinigung von rekombinant exprimiertem *L. pneumophila* His<sub>6</sub>-PatA, His<sub>6</sub>-PatAS73A und His<sub>6</sub>-PatAK492Stop.** Chromatogramme des FPLC-Laufes des PatA- (A), PatAS73A- (C) bzw. PatAK492Stop (E) -Expressionsklon-Zelllysates über eine HisTrap HP Säule. Das gebundene PatA-, PatAS73A und PatAK492Stop-Protein zeigte einen einzigen Peak. SDS-PAGE der eluierten PatA- (B), PatAS73A (D) und PatAK492Stop (F) -Proteinfraktionen, die anschliessend *gepoolt* wurden. PatA und PatAS73A laufen im Gel bei einer Größe von 73 kDa, PatAK492Stop 54 kDa. St, Protein Standard

Aus den jeweiligen SDS-PAGEs ging hervor, dass alle FPLC-Fractionen von vergleichbarer Reinheit waren. Die gereinigten Proteine wurden zur Entfernung von Imidazol in Phosphatpuffer dialysiert und anschließend in einem Lipidhydrolyseversuch eingesetzt. Dort

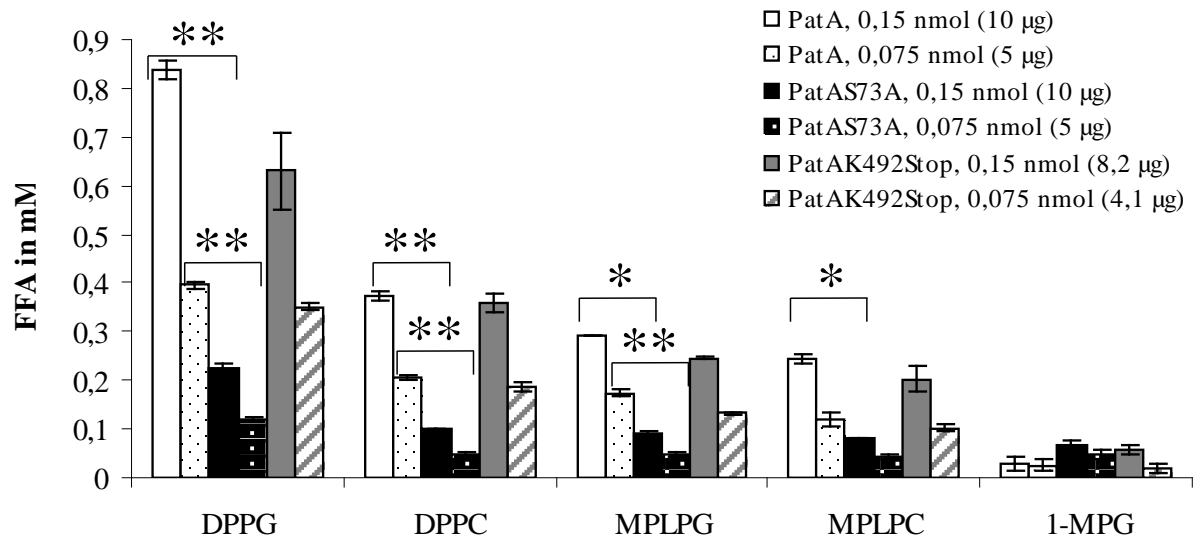
zeigte sich, dass PatA hauptsächlich DPPG hydrolysierte, allerdings auch Aktivität gegenüber DPPC, den Lysophospholipiden MPLPG und MPLPC sowie Cardiolipin, besaß (s. Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16: Lipidhydrolyseaktivität von His<sub>6</sub>-PatA und der katalytischen His<sub>6</sub>-PatAS73A-Mutante.**

A) Das hydrolytische Potential des gereinigten His<sub>6</sub>-PatA Proteins sowie der katalytischen Mutante des Proteins wurde durch Messen der freigesetzten Fettsäuren aus verschiedenen Lipidsubstraten nach einer Inkubationsdauer von 10 h bestimmt. Als Negativkontrolle, die von den Werten subtrahiert wurde, diente Tris-HCl-Puffer. B) Coomassie-Gel auf dem jeweils 10 µg der gereinigten Proteine His<sub>6</sub>-PatA und His<sub>6</sub>-PatAS73A aufgetragen wurden. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. ( $P < 0,05$  \*;  $P < 0,01$  \*\*; Student's T-Test)

Die katalytisch inaktive Proteinvariante PatAS73A, die ein mutiertes Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G, welches zu G-X-A-X-G modifiziert wurde, beinhaltete, besaß gegenüber allen fünf getesteten Substraten eine stark reduzierte Phospholipase- bzw. Lysophospholipaseaktivität. Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich ist, korrelierte die Menge freigesetzter Fettsäuren mit der Menge des eingesetzten Proteins. Das Lipasesubstrat 1-MPG konnte dagegen nicht umgesetzt werden. Da die verkürzte PatA-Variante ohne den C-Terminus, PatAK492Stop, ein geringeres Molekulargewicht besitzt, musste um die Stoffmenge zu beachten entsprechend weniger gereinigtes Protein eingesetzt werden.



**Abbildung 3.17: Lipidhydrolyseaktivität von His<sub>6</sub>-PatA und His<sub>6</sub>-PatAS73A-, His<sub>6</sub>-PatAK492Stop-Mutanten.** Das hydrolytische Potential des gereinigten His<sub>6</sub>-PatA-Proteins sowie der katalytischen Mutante des Proteins His<sub>6</sub>-PatAS73A und einer C-terminal verkürzten Proteinvariante His<sub>6</sub>-PatAK492Stop wurde durch Messen der freigesetzten Fettsäuren aus verschiedenen Lipidsubstraten nach einer Inkubationsdauer von 7 h bestimmt. Es wurden jeweils zwei verschiedene Molaritäten eingesetzt. Als Negativkontrolle, die von den Werten subtrahiert wurde, diente Tris-HCl-Puffer. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (P < 0,05 \*; P < 0,01 \*\*; Student's T-Test)

Die lipolytische Aktivität von PatAK492Stop war, abgesehen von einer etwas geringeren Aktivität gegenüber DPPG, annähernd mit der Aktivität von PatA vergleichbar. Der C-Terminus scheint, wie für die hämolytische Aktivität bereits festgestellt, keinen Einfluss auf das lipolytische Potential von PatA zu haben. Damit lag die Schlussfolgerung nahe, dass die Phospholipaseaktivität von PatA eindeutig zur N-terminal gelegenen Patatindomäne des Proteins zugeordnet werden muss. Die funktionale Organisation von PatA in den N-Terminus, der die Patatindomäne beinhaltet und auf Grund dessen ausschließlich für die lytischen Eigenschaften des Proteins verantwortlich zu sein scheint, wirft die Frage nach der Funktion des C-Terminus auf. In Vorarbeiten (196) wurde dem C-terminalen Bereich von PatA bereits eine Funktion für die Lokalisation an der Wirtszellmembran zugeschrieben. Dieser Aspekt sollte im weiteren Verlauf der Arbeit näher betrachtet werden.

### 3.2.4 Lokalisation von PatA in Wirtszellen

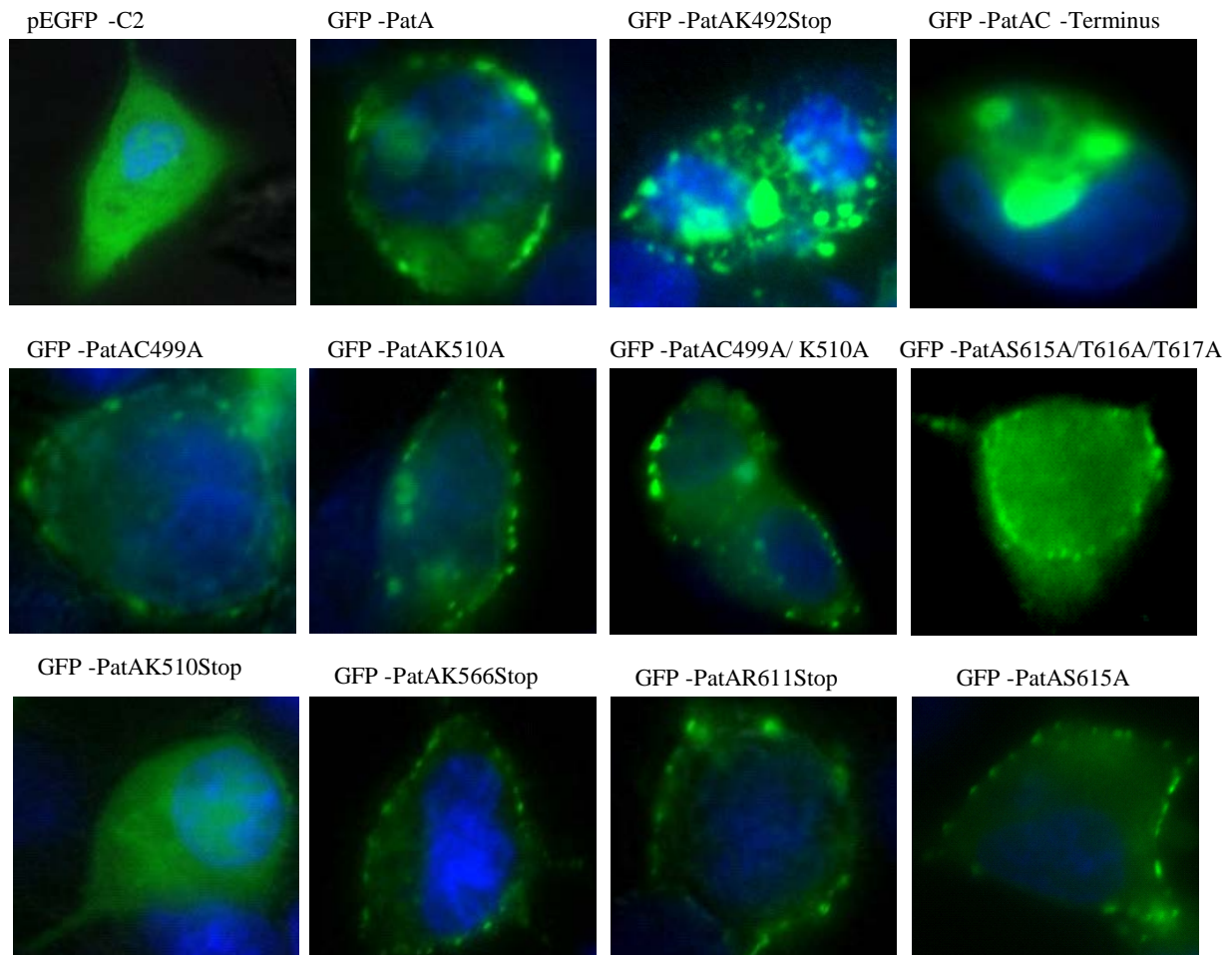
PatA wird über das Virulenz-assoziierte Typ IVB Dot/Icm-Proteinsekretionssystem von *L. pneumophila* in die Wirtszelle injiziert (166, 177). In Vorarbeiten wurde N-terminal-GFP-

gekoppeltes PatA sowie eine um 129 Aminosäuren verkürzte Variante des Proteins, der der komplette C-Terminus fehlt, nach Transfektion in A549 Lungenepithelzellen exprimiert. Kolokalisationsstudien mit E-Cadherin, ein in der Zytoplasmamembran verankertes Transmembranprotein, zeigten eine Assoziation von PatA mit der Zytoplasmamembran. Fehlt dem Protein jedoch der C-Terminus, lokalisiert PatA bevorzugt in granulären Strukturen im Inneren der Wirtszelle (196). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass der C-terminale Bereich für die Lokalisation des Proteins an der Zytoplasmamembran eine entscheidende Rolle spielt.

#### 3.2.4.1 Lokalisation von PatA in transfizierten A549 Lungenepithelzellen – Rolle des C-Terminus

Da noch ungeklärt war, wie der C-Terminus von PatA die Lokalisation an der Plasmamembran bestimmt, wurden am GFP-PatA-Konstrukt mehrere spezifische Modifikationen durchgeführt. Eine effiziente Membranbindung zahlreicher eukaryotischer Proteine, insbesondere solche, die in Signalkaskaden involviert sind (z. B. Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, G-Protein-Untereinheiten, Proteine der Ras-Superfamilie), wird durch einzelne oder mehrfach vorkommende Azylierungsmotive z. B. für Myristoylierung, Palmitoylierung und Farnesylierung ermöglicht (227). Definierte Azylierungsmuster bestimmter Proteinbereiche mit spezifischen Lipidketten ermöglichen sogar die differenzielle Lokalisation der lipidierten Proteine an bestimmte Membranbereiche wie z. B. an *Lipid Rafts*, Endosomen oder die Zellpole. Da PatA keine besonderen hydrophoben Bereiche enthält, könnte insbesondere eine Palmitoylierung die Lipophilie des Proteins erhöhen und somit die subzelluläre Verteilung des Proteins beeinflussen und hypothetisch auch die Lokalisation an der Plasmamembran bedingen (228). Bei eukaryonten Proteinen findet eine Palmitoylierung in der Regel über die S-Azylierung von Cysteinresten statt. Bei bakteriellen Proteinen wie z. B. Hämolysin A (Hly A) von *E. coli* oder Adenylat-Cyclase-Toxin A (Cya A) von *Bordetella pertussis*, wurde eine Palmitoylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins nachgewiesen (229, 230). Im C-Terminus von PatA befinden sich ein Cysteinrest C499 und 12 Lysinreste. Allerdings weist nur Lysin K510 das für die Azylierung bakterieller Proteine charakteristische Motiv „GK“ auf (231). Da diese beiden Aminosäuren im Verdacht standen, als potentielle Azylierungsstellen zu fungieren und damit über diese Modifikation die Plasmamembranlokalisation zu beeinflussen, wurden C499 und K510 im pEGFP-C2-PatA-Vektor jeweils einzeln und auch beide zusammen zu Alanin mutiert und nach Expression in

A549 Lungenepithelzellen hinsichtlich einer Lokalisationsänderung geprüft. Wie aus Abbildung 3.18 ersichtlich ist, bewirkte sowohl der Einzelaustausch der Aminosäuren C499 und K510 zu Alanin als auch der Austausch beider Aminosäuren gleichzeitig keine Änderung der Proteinlokalisierung an der Zytoplasmamembran.

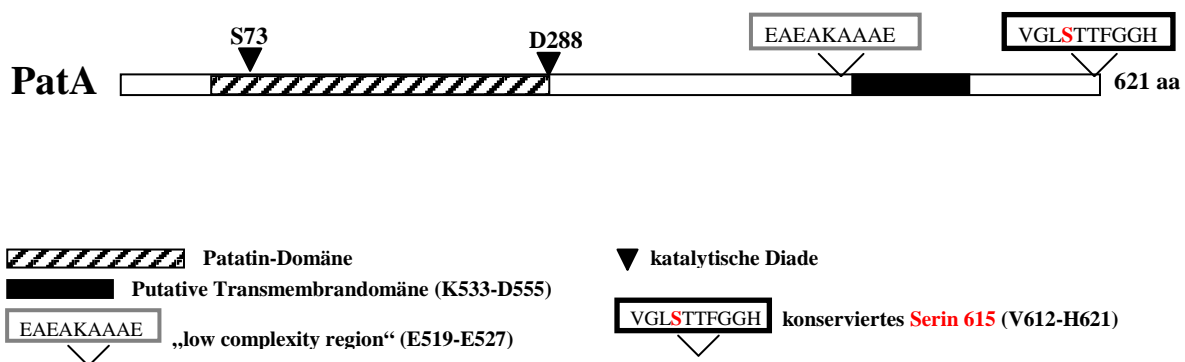


**Abbildung 3.18: Lokalisation von GFP-PatA und mutierter GFP-PatA-Versionen in transfizierten A549 Lungenepithelzellen.** GFP-PatA ist vorwiegend an der Zytoplasmamembran lokalisiert, während das Protein ohne den C-Terminus (GFP-PatAK492Stop), bzw. der C-Terminus allein an GFP gekoppelt (GFP-PatAC-Terminus) eine zytoplasmatisch-aggregierte Lokalisation zeigen. Die Mutationen an einzelnen Aminosäuren bewirkten keine Änderung der Membranlokalisierung. Ebenso lokalisierten die beiden im C-Terminus verkürzten Proteinvarianten GFP-PatAK566Stop und GFP-PatAR611Stop an der Zellperipherie. Dagegen zeigte das verkürzte Protein GFP-PatAK510Stop eine dem Leervektor (pEGFP-C2) vergleichbare diffuse zytoplasmatische Lokalisation. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Nicht transfizierte A549 Lungenepithelzellen wurden als Kontrolle mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Mehrzahl der mit GFP-PatA transfizierten Zellen zeigte eine abgerundete Zellmorphologie und eine Konzentration des Proteins als „punktierte“ Strukturen an der Zellperipherie. Fehlt PatA jedoch der C-Terminus (GFP-PatAK492Stop), bildet das Protein bevorzugt Aggregate im Zytoplasma der Wirtszelle. Ebenso konnte eine zytoplasmatische Lokalisation bei der Proteinvariante, wo ausschließlich der C-Terminus an GFP fusioniert wurde (GFP-PatAC-Terminus), beobachtet werden. Die Zellen, die diesen Vektor exprimierten, schienen sich allerdings in einem schlechten physiologischen Zustand zu befinden, was darauf hin weist, dass die Expression der C-terminalen 129 Aminosäuren von PatA zellschädigende Effekte verursacht. Der Austausch der verbliebenen Lysine und damit potentiellen Azylierungsstellen im C-Terminus von PatA (K494, K501, K523, K533, K550, K557, K566, K580, K590 und K609) bewirkte ebenfalls keine Änderung der Lokalisation von GFP-PatA an der Zytoplasmamembran (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde der C-Terminus von PatA, der keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen aufweist, auf das Vorhandensein konservierter Aminosäuren oder Proteindomänen hin untersucht. Durch Blast-Analyse wurde ein in den Stämmen *L. pneumophila* Philadelphia, Corby, Paris und Alcoy konserviertes Serin an Position 615 im C-Terminus identifiziert (s. Abbildung 3.19). Diesem Serin folgen im Stamm Philadelphia zwei Threoninreste an Position 616 und 617, wobei T617 im Stamm Paris ebenfalls vorhanden ist. In den anderen vorweg genannten Stämmen sind an Position 616 und 617 zwei hydrophile Serinreste vorhanden, weshalb vermutet wurde, dass es sich um ein hydrophiles Motiv handeln könnte. Ein Austausch des Serin 615 zu Alanin und der drei Aminosäuren S615/ T616/ T617 gleichzeitig bewirkte jedoch auch keine Änderung der peripheren Zytoplasmamembranlokalisation von PatA (s. Abbildung 3.18). Deshalb wurde beschlossen, eine sequentielle Verkürzung des C-Terminus von GFP-PatA vorzunehmen, um zunächst essentielle Sequenzen für die Lokalisation an der Plasmamembran ermitteln zu können. Gibt man die 129 C-terminalen Aminosäuren von PatA in das Programm „SOSUI“, das Vorhersagen zu Sekundärstrukturen von Proteinen macht, ein, so wird für PatA eine putative Transmembranregion zwischen den Aminosäuren Lysin 533 und Asparaginsäure 555 vorhergesagt. Da dies ein für die Lokalisation wichtiger Bereich sein könnte, wurde das Protein einige Aminosäuren vor dieser Region nach Lysin 510 (GFP-PatAK510Stop) und nach diesem Bereich an Position Lysin 566 (GFP-PatAK566Stop) verkürzt. Ebenso wurde eine GFP-PatA-Variante entworfen, bei der nur die letzten 10 Aminosäuren des C-Terminus fehlten (GFP-PatAR611Stop). Das kürzeste Protein GFP-PatAK510Stop zeigte eine dem Leervektor (pEGFP-C2) vergleichbare diffuse zytoplasmatische Lokalisation, wohingegen die beiden anderen Proteine GFP-PatAK566Stop

und GFP-PatAR611Stop überwiegend an der Zytoplasmamembran lokalisierten. Somit lag die Schlussfolgerung nahe, dass sich der für die Lokalisation von PatA essentielle Bereich im C-Terminus zwischen den Aminosäuren Lysin 510 und Lysin 566 befindet.

Innerhalb des PatA-C-Terminus fielen im Bereich vor Lysin 566 zwei Proteinregionen auf (s. Abbildung 3.19). Zum einen befindet sich zwischen den Aminosäuren Glutamat 519 bis Glutamat 527 eine so genannte „*low complexity region*“<sup>1</sup>, die durch das gehäufte Auftreten einer Aminosäure oder Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften gekennzeichnet ist (232). Im Fall von PatA handelt es sich dabei um das gehäufte Auftreten von Glutamat und Alanin. Diese Regionen werden deshalb auch als CBRs (*composition biased regions*) bezeichnet, die als flexible *linker*- oder *spacer*-Sequenzen zwischen kompakten Domänen fungieren können, für die aber auch eine Funktion für die Bindung von Proteinen oder anderen Substraten beschrieben wurde (232-234). Da diese Region eine mögliche Rolle bei der Zytoplasmamembranlokalisation von PatA spielen könnte, wurde der gesamte Bereich inklusive der Aminosäuren E519 und E527 deletiert.



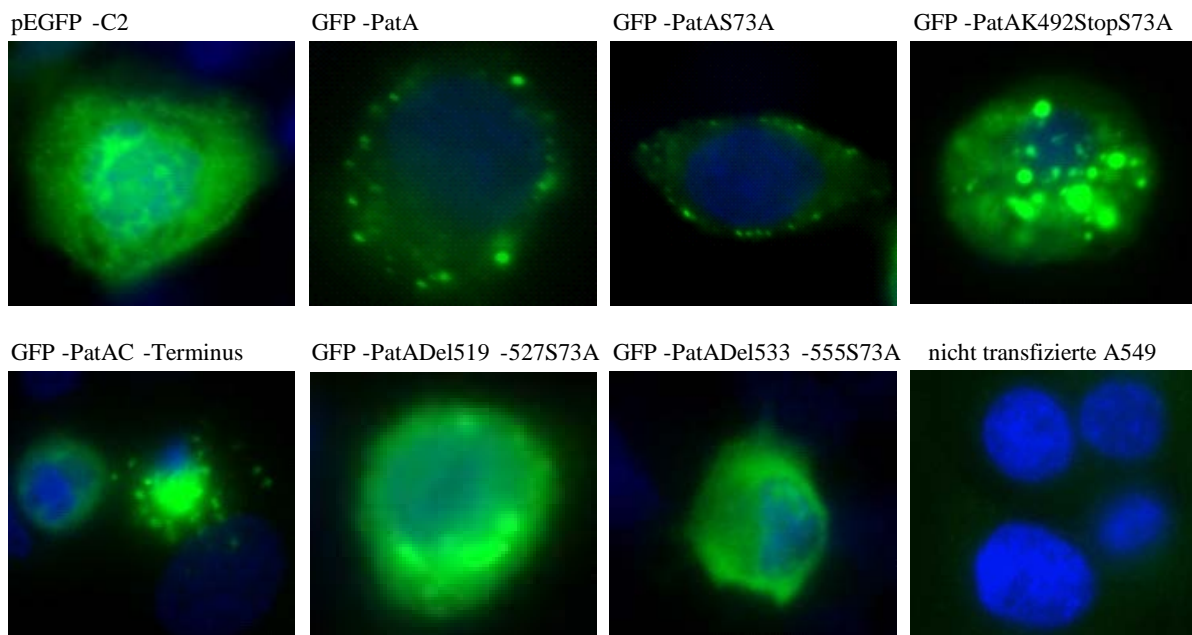
**Abbildung 3.19: Schematische Darstellung wichtiger funktionaler Bereiche und Domänen im PatA-Protein.** Die Patatin-Domäne beinhaltet die aus den Aminosäuren Serin 73 und Aspartat 288 bestehende katalytische Diade. Innerhalb des C-Terminus befindet sich eine „*low complexity region*“, eine putative Transmembrandomäne und im Bereich der letzten 10 Aminosäuren ein konserviertes Serin an Position 615.

Die putative Transmembranregion zwischen den Aminosäuren Lysin 533 und Aspartat 555 wurde ebenfalls komplett deletiert und für Transfektionsversuche eingesetzt. In Abbildung 3.20 wurde für die beiden Deletionsmutanten je ein repräsentatives mikroskopisches Bild, auf dem eine diffuse, zytoplasmatische Lokalisation der Proteine erkennbar ist, dargestellt. Das

<sup>1</sup> [www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de)



Vorhandensein beider Regionen scheint deshalb für eine periphere Lokalisation von PatA wichtig zu sein. Neben der Deletion wurde bei diesen Proteinvarianten zusätzlich noch eine Mutation des katalytisch essentiellen Serin 73 zu Alanin vorgenommen, da im Laufe der Versuche festgestellt wurde, dass die A549 Lungenepithelzellen die katalytisch inaktive Variante des PatA-Proteins offenbar besser tolerieren, da die Zellen mehr Protein exprimierten und damit die Signalstärke teilweise stieg.



**Abbildung 3.20: Lokalisation von GFP-PatA und mutierter GFP-PatA-Versionen in transfizierten A549 Lungenepithelzellen.** GFP-PatA ist vorwiegend an der Zytoplasmamembran lokalisiert, ebenso die katalytisch inaktive Variante des Proteins GFP-PatAS73A, während eine katalytische Mutante des Proteins ohne den C-Terminus (GFP-PatAK492StopS73A), bzw. der C-Terminus allein an GFP gekoppelt (GFP-PatAC-Terminus) eine zytoplasmatisch-aggregierte Lokalisation zeigten. Die beiden katalytisch inaktiven Deletionsmutanten GFP-PatADel519-527S73A und GFP-PatADel533-555S73A zeigten eine dem Leervektor (pEGFP-C2) vergleichbare diffuse zytoplasmatische Lokalisation. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Nicht transfizierte A549 Lungenepithelzellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Auch das katalytisch inaktive GFP-PatAS73A lokalisierte wie GFP-PatA in „punktierten“ Strukturen an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, während eine katalytische Mutante des Proteins ohne den C-Terminus (GFP-PatAK492StopS73A) eine zytoplasmatisch-aggregierte Lokalisation zeigte. Bei allen Transfektionsversuchen wurde stets eine Expressionskontrolle im Western Blot durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Um die Häufigkeit, mit der GFP-PatA und die katalytisch inaktiven, mutierten GFP-PatA-Proteine in transfizierten A549

Wirtszellen eine zytoplasmatische Lokalisation zeigen, abschätzen zu können, wurde im Folgenden eine Quantifizierung vorgenommen.

#### 3.2.4.2 Lokalisation von PatA in transfizierten A549 Lungenepithelzellen – Quantifizierung der Lokalisation mutierter GFP-PatA-Proteinvarianten

Mit Ausnahme von GFP-PatA wurden für eine Quantifizierung der Häufigkeit, mit der eine bestimmte Proteinvariante peripher an der Zytoplasmamembran oder zytoplasmatisch lokalisierte, die Konstrukte verwendet, bei denen ein Aminosäureaustausch des katalytisch essentiellen Serin 73 zu Alanin vorgenommen wurde. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 3.21 dargestellt.

Die Transfektionseffizienz lag zwischen 11 und 21 %, wobei die beiden Volllängenproteine GFP-PatA und GFP-PatAS73A die höchste Effizienz besaßen und es damit keinen Unterschied zwischen der katalytisch aktiven und der inaktiven Proteinvariante gab. Auch die Häufigkeit der transfizierten Zellen, bei denen das GFP-Protein-Signal an der Zytoplasmamembran zu finden war, betrug 60 % für GFP-PatA und 56 % für GFP-PatAS73A und war damit für beide Proteine sehr ähnlich. Dagegen erschien der C-Terminus allein an GFP gekoppelt nicht an der Zytoplasmamembran. Die Wirtszellen, die GFP-PatAC-Terminus exprimierten, befanden sich in einem schlechten physiologischen Zustand, was eventuell auf toxische Effekte zurückzuführen ist. Es scheint, dass diese Zellen einen apoptotischen Prozess initiieren, da sie schrumpfen, der Zellkern kleiner und kompakter erscheint und bei einigen Zellen in mehrere Teile zerfällt.

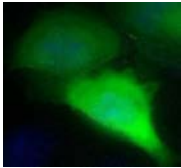

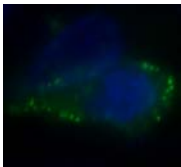

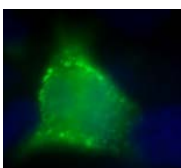
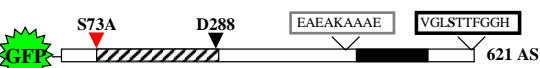
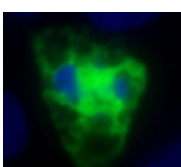

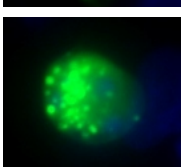
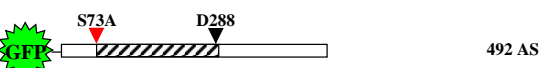
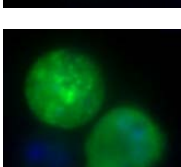
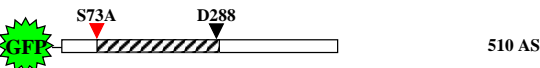
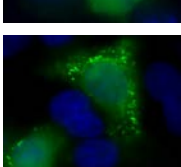
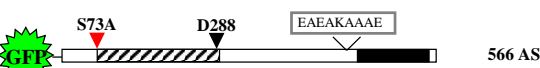
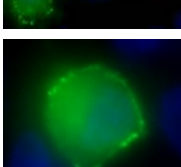
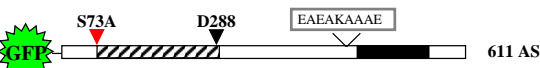
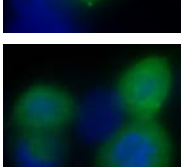
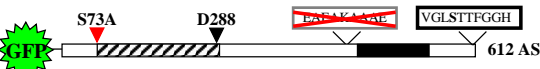
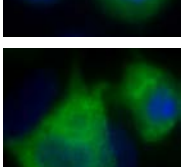

			MW (kDa)	transf. Zellen (%)	Membran- lokalisation (%)	zytoplasm. Lokalisation (%)
	GFP		27	11	0	100
	GFP-PatA		96	21	60	40
	GFP-PatAS73A		96	21	56	44
	GFP-PatAC-Terminus		42	16	0	100
	GFP-PatAK492StopS73A		82	14	0	100
	GFP-PatAK510StopS73A		84	12	0	100
	GFP-PatAK566StopS73A		90	12	62	38
	GFP-PatAR611StopS73A		96	13	50	50
	GFP-PatADel519-527S73A		95	16	7	93
	GFP-PatADel533-555S73A		94	17	0	100

Abbildung 3.21: Darstellung der generierten GFP-PatA-Konstrukte und deren Lokalisation nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen. Angegeben sind die Patatindomäne (schraffiert), die katalytische

Diade S73 und D288 (schwarze Dreiecke), die außer bei GFP-PatA zu A73 (rotes Dreieck) ausgetauscht wurde, die putative Transmembrandomäne (schwarzer Balken) zwischen K533 und D555, sowie die „*low complexity region*“ zwischen E519 und E527 (graue Box) und die letzten zehn Aminosäuren (schwarze Box). Die angegebene Aminosäurenlänge bezieht sich nur auf PatA ohne GFP. Für jedes Konstrukt wurde das Molekulargewicht (MW) inklusive GFP angegeben, sowie die Transfektionseffizienz und die Häufigkeit der Lokalisation an der Zytoplasmamembran oder zytoplasmatisch. Dafür wurden jeweils fünf repräsentative mikroskopische Ausschnitte, die zwischen 31 und 95 Zellen enthielten, ausgezählt. Außerdem wurde ein repräsentatives mikroskopisches Bild für jede Proteinvariante dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Ebenfalls keine Zytoplasmamembranlokalisation wurde bei den Proteinen ohne den C-Terminus (GFP-PatAK492StopS73A) und der Variante, der der größte Teil des C-terminalen Bereiches ab Aminosäure K510 fehlt (GFP-PatAK510StopS73A), beobachtet. Der hintere Bereich des C-Terminus nach Aminosäure K566 scheint für die Lokalisation nicht essentiell zu sein, da bei beiden Proteinvarianten GFP-PatAK566StopS73A und GFP-PatAR611StopS73A 62 % bzw. 50 % der Zellen eine Lokalisation an der Zytoplasmamembran zeigten, was ungefähr dem Niveau des Volllängenproteins entsprach. Wie schon in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben, bewirkten die Deletion der „*low complexity region*“ (GFP-PatADel519-527S73A) und der putativen Transmembrandomäne (GFP-PatADel533-555S73A) den fast vollständigen Verlust der Fähigkeit an der Zytoplasmamembran zu lokalisieren, was bei diesem Experiment quantitativ mit den Prozentsätzen 93 % bzw. 100 % für eine zytoplasmatische Lokalisation belegt werden konnte. Zur Kontrolle der Expression diente ein Western Blot, der in Abbildung 3.22 dargestellt ist.

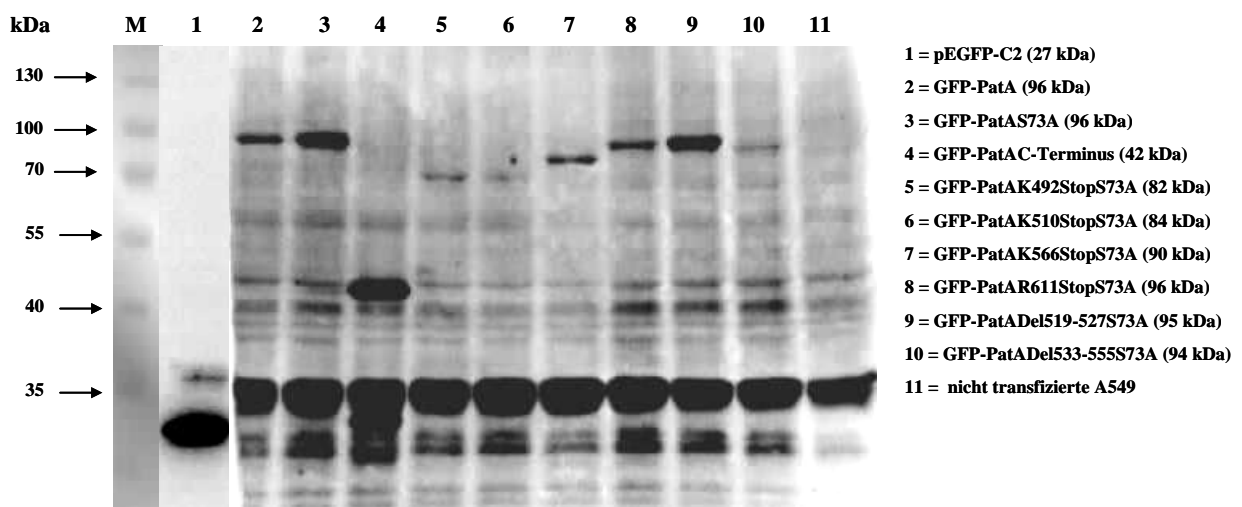


Abbildung 3.22: Western Blot mit GFP-spezifischem Antikörper zur Kontrolle der Expression verschiedener GFP-PatA-Proteinvarianten nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen. Zum

Nachweis gebildeter GFP-PatA-Fusionsproteine wurde ein GFP-spezifischer Antikörper eingesetzt. Für jede Proteinvariante wurde in Klammern das entsprechende Molekulargewicht angegeben.

Für GFP und jede der neun GFP-PatA-Proteine konnten im Western Blot Banden, die in ihrer Signalstärke jedoch sehr unterschiedlich ausfielen, detektiert werden. Da im Western Blot, der mit einem GFP-Antikörper durchgeführt wurde, das Auftreten einer starken unspezifischen Bande zu verzeichnen war, die auch in der Kontrolle, d. h. den nicht transfizierten A549 Zellen sichtbar war, wurden deshalb parallel auch Western Blots mit PatA-spezifischen Antikörpern durchgeführt (s. Abbildung 3.23).

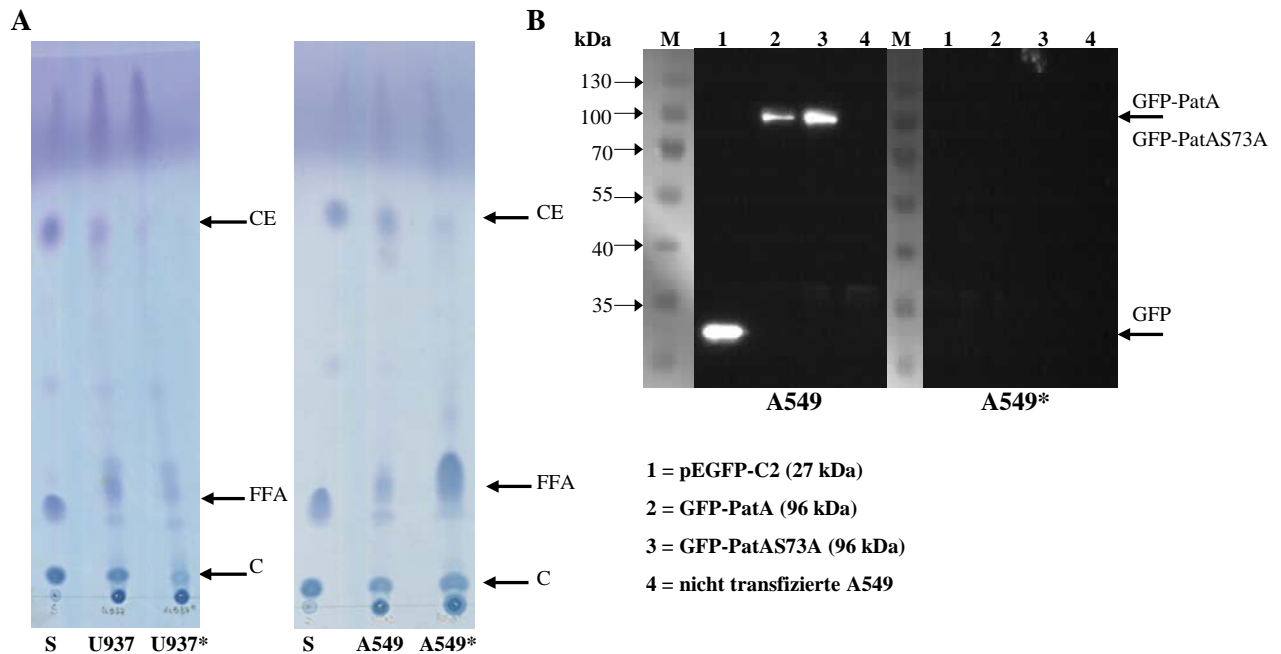


**Abbildung 3.23: Western Blot mit PatA-spezifischem Antikörper zur Kontrolle der Expression verschiedener GFP-PatA-Proteinvarianten nach Transfektion von A549 Lungenepithelzellen.** Zum Nachweis gebildeter GFP-PatA-Fusionsproteine wurde ein PatA-spezifischer Antikörper eingesetzt. Für jede Proteinvariante wurde in Klammern das entsprechende Molekulargewicht angegeben.

Dieser Antikörper detektierte jedoch nur GFP-PatA, GFP-PatAS73A, GFP-PatAK566StopS73A und GFP-PatAR611StopS73A. Außerdem wurde bei diesen Western Blots festgestellt, dass die Proteine, bei denen der Austausch des katalytischen Serin 73 zu Alanin erfolgte, stets stärker exprimiert wurden, als das katalytisch aktive GFP-PatA.

### 3.2.4.3 Spezifizierung der Lokalisation von PatA in transfizierten Wirtszellen – Depletion von Cholesterol

Da GFP-PatA nach Expression in A549 Lungenepithelzellen charakteristisch in „punktierten“ Strukturen an der Zytoplasmamembran lokalisiert, wurde vermutet, dass das Protein möglicherweise mit *Lipid Rafts* assoziiert. *Lipid Rafts* wurden ursprünglich als Detergenzien-resistente Membranen (DRM), die durch Unlöslichkeit in einigen Detergenzien unter bestimmten Bedingungen gekennzeichnet sind und in denen eine Anreicherung von Cholesterol, Sphingolipiden und Glycerophosphatidylinositol-verankerten Proteinen zu verzeichnen ist, entdeckt (235-238). Abgesehen von ihrer wichtigen Rolle bei der Signaltransduktion, der Rezeptor-Internalisierung, dem Vesikel-*Sorting* und dem Transport von Cholesterol (239), werden *Lipid Raft*-Komponenten oft als spezifische Rezeptoren für den Zelleintritt von Toxinen, pathogenen Bakterien oder Viren ausgenutzt (240-242). Da noch ungeklärt ist, welche Rolle PatA an der Zytoplasmamembran spielt, wäre eine Spezifizierung der Lokalisation im Bereich der *Lipid Rafts* ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion des Proteins. Dazu wurden zunächst A549 Lungenepithelzellen für eine Woche in RPMI, das mit 10 % delipidiertem FCS versetzt wurde, kultiviert, um in den Zellen eine Reduktion des Cholesterolanteils zu bewirken (202). Es wurde vermutet, dass sich dadurch Änderungen der Lokalisation von GFP-PatA ergeben könnten, was die Hypothese einer Anlagerung an Cholesterol-reiche *Lipid Rafts* untermauern würde. Durch diese Art der Kultivierung konnte jedoch weder eine Reduktion von Cholesterol nachgewiesen werden, noch eine Expression von GFP-PatA oder GFP-PatAS73A (s. Abbildung 3.24). Außerdem verloren die A549 Lungenepithelzellen ihre Fähigkeit zu adhären, rundeten sich ab und waren oft zu „Clustern“ oder Zellhaufen geballt.



**Abbildung 3.24: Dünnschichtchromatographie der für Transfektionsexperimente verwendeten U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen und Western Blot der A549 Transfektion mit GFP-PatA.** A) Dünnschichtchromatographie von U937 Makrophagen ( $1,8 \times 10^6$  Zellen), die entweder für 48 h in RPMI mit 10 % FCS (U937) oder RPMI mit 10 % delipidiertem FCS (U937\*) kultiviert wurden. A549 ( $2,5 \times 10^6$  Zellen) wurden 7 d in RPMI mit 10 % FCS (A549) oder RPMI mit 10 % delipidiertem FCS (A549\*) kultiviert. Spuren: S, Standard: C, Cholesterin, FFA, Freie Fettsäuren, CE, Cholesterolester. B) Western Blot mit einem PatA- und GFP-spezifischen Antikörper in Kombination zur Kontrolle der Expression von GFP-PatA und GFP-PatAS73A nach Transfektion von A549 und A549\*. Die Experimente wurden für jede Zelllinie zweifach wiederholt.

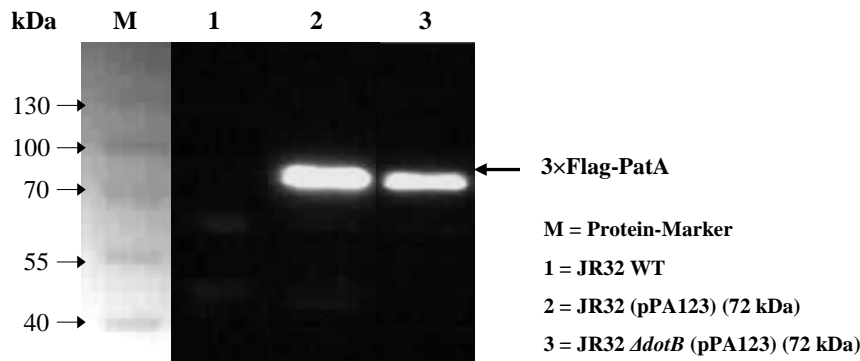
Auch im mikroskopischen Bild war bei den transfizierten A549 aus der Anzucht mit delipidiertem Serum im Gegensatz zu „normal“ kultivierten Zellen keine Expression zu erkennen. Die Dünnschichtchromatographie zeigte keinen Unterschied im Cholesterolspot. Es fiel jedoch auf, dass bei in delipidiertem Serum kultivierten A549 der Spot für die freien Fettsäuren wesentlich größer war und im Gegensatz dazu der Spot für Cholesterolester bedeutend schwächer im Vergleich zu den Spots für die „normal“ kultivierten Zellen. Die Fettsäuren scheinen sich während der Kultivierung anzuhäufen, da sie offenbar nicht mehr zu Cholesterolester verestert werden können. Auf Grund der Tatsache, dass sich mit dieser Methodik keine Cholesterol-reduzierten A549 Lungenepithelzellen generieren ließen und die Zellen nach dieser Art der Kultivierung nicht mehr transfizierbar waren, wurden als Alternative U937 Makrophagen, die defizient sind, Cholesterin endogen zu synthetisieren und für die eine Reduktion von Cholesterin nach 48-stündiger Kultivierung in RPMI mit 10 % delipidiertem FCS beschrieben wurde (202), für weitere Transfektionsexperimente benutzt. Bei den U937 Makrophagen, die in RPMI mit 10 % delipidiertem FCS kultiviert wurden,

fielen die Dünnschichtchromatographie-Spots für Cholesterol und Cholesterolerster im Vergleich zu konventionell kultivierten U937 Zellen deutlich schwächer aus, während der Spot für die freien Fettsäuren nahezu vergleichbar war (s. Abbildung 3.24). Bei U937 Makrophagen bewirkte eine 48-stündige Kultivierung unter Verwendung von delipidiertem Serum also tatsächlich eine Reduktion des Cholesterolgehaltes. Allerdings konnte im Western Blot nach Transfektion von konventionell und alternativ kultivierten U937 Zellen mit GFP-PatA/ GFP-PatAS73A in beiden Fällen keine Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die mikroskopischen Ergebnisse fielen für die Transfektion von U937 Makrophagen recht unterschiedlich aus. Bei konventionell kultivierten Zellen wurde entweder nicht der Phänotyp der Zytoplasmamembran-Lokalisation für GFP-PatA, sondern eine aggregierte zytoplasmatische Lokalisation beobachtet, oder es war nur eine verstärkte Hintergrundfluoreszenz zu verzeichnen. Alternativ in delipidiertem Serum kultivierte U937 Zellen zeigten dagegen gar keine Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde auch auf Grund des fehlenden Expressionsnachweises im Western Blot davon ausgegangen, dass eine Transfektion von U937 Makrophagen unter diesen Bedingungen nicht möglich war.

#### 3.2.4.4 Lokalisation von PatA in *L. pneumophila* und infizierten U937 Makrophagen

Der Lokalisationsnachweis von PatA in infizierten Wirtszellen sollte durch eine Markierung des Proteins mit einem dreifach Flag-Tag und einer anschließenden Detektion über einen spezifischen Flag-Tag-Antikörper und einen spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper (s. 2.1.6) geschehen. Zwei Konstrukte standen dafür zur Verfügung: pPA99 (pBCKS + 3 × Flag-*P<sub>mip</sub>*-*patA*), ein Vektor, der eine Überexpression von PatA ermöglichte und pPA123 (pBCKS + 3 × Flag-*P<sub>patA</sub>*-*patA*), in den das *patA*-Gen mit seinem nativen Promotor hinein kloniert wurde. Zunächst wurde geprüft, ob sich der Typ IVB-sekretierte Effektor PatA in einer JR32 *AdotB*-Sekretionsmutante mit *L. pneumophila* assoziiert nachweisen lässt. Dafür wurde die Expression von PatA in *L. pneumophila* JR32 Flüssigkulturen mittels Western Blot nachgewiesen (s. Abbildung 3.25), ein Teil der Kultur wurde fixiert und anschließend so behandelt, dass eine immunfluoreszenzmikroskopische Begutachtung erfolgen konnte. Mit beiden Expressionsvektoren, sowohl pPA99 für eine Überexpression als auch pPA123 für eine native Expression, wurde auf diese Weise verfahren.



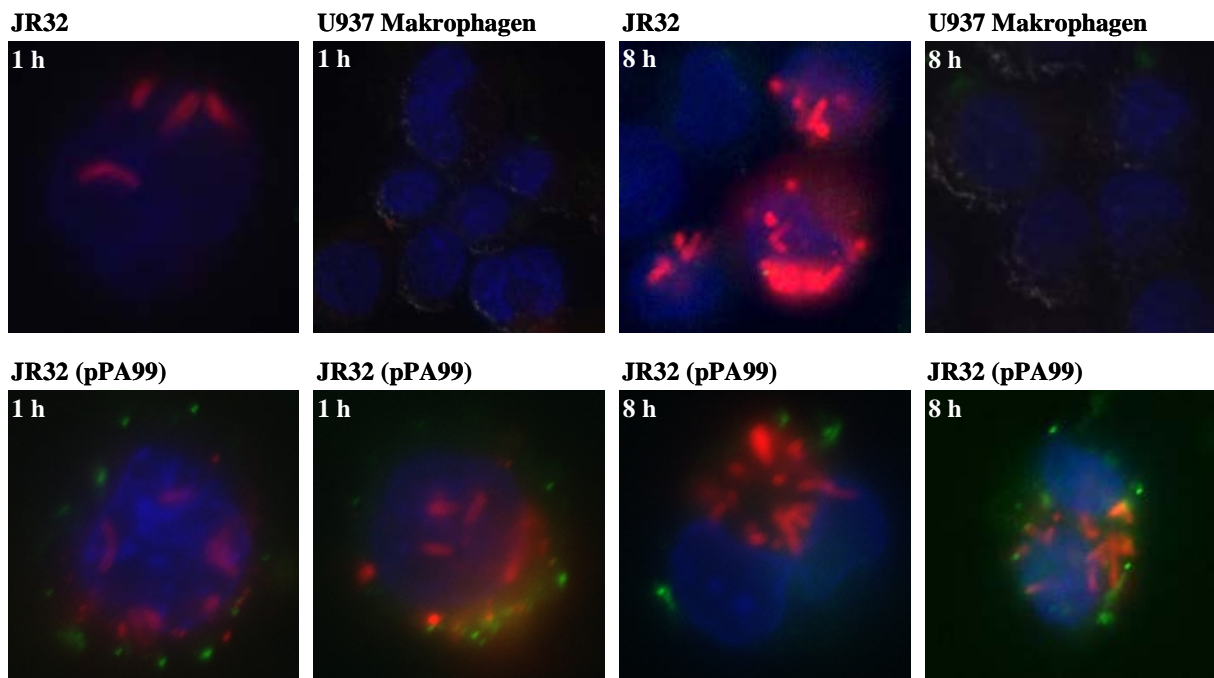


**Abbildung 3.25: Western Blot zur Kontrolle der Expression von pPA123 in *L. pneumophila* JR32 Stämmen.** Das Flag-PatA-Protein (Molekulargewicht 72 kDa) wurde in Zelllysaten von JR32 (pPA123) und JR32 *ΔdotB* (pPA123) nachgewiesen. Als Kontrolle wurde der JR32 Wildtyp (WT) mitgeführt. Die Detektion erfolgte über den Flag-Tag durch einen spezifischen Flag-Tag-Antikörper und einen Maus-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

Für die Immunfluoreszenzfärbung der fixierten *L. pneumophila* JR32 Stämme wurden die Proben jeweils mit 2 oder 4 mg/ml Lysozym, das eine permanente Porenbildung der Zelle bewirkt, behandelt. Dem Antikörperpuffer wurde jeweils eines der insgesamt vier getesteten Detergenzien/Chelatoren Saponin, Triton X-100, SDS und EDTA zugesetzt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in keinem der Fälle ein Bakterien-assoziiertes, durch den Einsatz des Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörpers, grün leuchtendes Flag-Tag-PatA-Signal detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dafür traten bei allen Stämmen unspezifische Signale auf („Sternenhimmel“), die vor allem im Falle des Einsatzes von SDS verstärkt wurden, aber nicht mit *Legionella* assoziiert zu sein schienen.

Aufgrund der Beobachtung, dass PatA nach Transfektion in A549 Lungenepithelzellen an der Zytoplasmamembran lokalisierte, wurde vermutet, dass sich das von intrazellulären *Legionella*-Bakterien sekretierte Protein während einer Wirtszellinfektion ebenfalls an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle lokalisieren lässt. Für PatA wurde durch Brüggemann und Mitarbeiter bereits eine verstärkte Expression in einer späten Phase des intrazellulären Lebenszyklus, d. h. wenn bakterielle Virulenzeigenschaften verstärkt exprimiert werden, beschrieben (67). Im Infektionsmodell mit *Acanthamoeba castellanii* wurde eine 11-fach stärkere Expression von PatA während der späten Infektionsphase, d. h. nach 14 h zum Ende der Phase der intrazellulären Replikation und Übergang in die transmissive Phase, im Vergleich zur replikativen Phase nach acht Stunden, festgestellt (67). Für die Untersuchung der Expression von PatA während der Infektion von U937 Makrophagen wurden drei

verschiedene Infektionszeitpunkte ausgewählt. Die Expressionskontrolle durch einen Western Blot, sowie die Fixierung der Proben für die Immunfluoreszenzfärbung erfolgten nach einer Infektionsdauer von 20 min, 1 h und 8 h. Durch Überexpression des Flag-PatA-Proteins mit Hilfe des Vektors pPA99 (pBCKS + 3 × Flag\_P<sub>mip</sub>\_patA) konnte das Protein nach Infektion mit *L. pneumophila* in U937 Makrophagen sowohl nach einer Infektionsdauer von einer Stunde als auch nach acht Stunden (jedoch nicht nach 20 min) in punktierten Strukturen an der Wirtszellzytoplasmamembran nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.26).



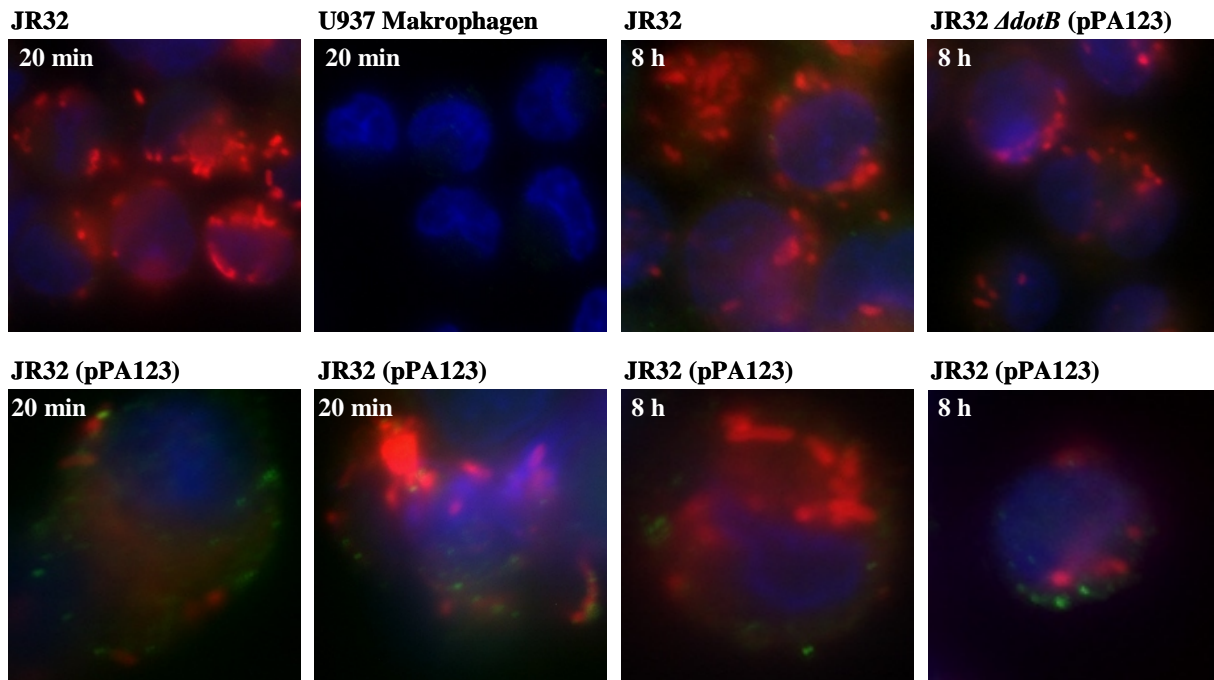
**Abbildung 3.26: U937 Makrophagen-Infektion mit *L. pneumophila* JR32 und *L. pneumophila* JR32 (pPA99).** Durch Einbringen des Vektors pPA99 (pBCKS + 3 × Flag\_P<sub>mip</sub>\_patA) in *L. pneumophila* JR32 erfolgte eine Überexpression von Flag-PatA, das nach Infektion von U937 Makrophagen (MOI 100) an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle lokalisiert. Legionellen wurden unter Verwendung von 0,1 % Saponin mit polyklonalem *Legionella*-spezifischem Primärantikörper (1:300) und Alexa Fluor 594-konjugiertem *anti*-Kaninchen Sekundärantikörper (1:500) (rot) gefärbt. Flag-PatA wurde mit *anti*-Flag Primärantikörper (1:1000) und Alexa Fluor 488-konjugiertem *anti*-Maus Sekundärantikörper (1:1000) (grün) gefärbt. Als Kontrolle dienen U937 Zellen, die nur mit JR32 infiziert wurden oder nicht infizierte Zellen, bei denen nur der durch DAPI (blau) gefärbte Zellkern zu erkennen ist. Dargestellt sind die Infektionszeitpunkte nach 1 h und nach 8 h. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Mit *L. pneumophila* JR32 infizierte U937 Makrophagen zeigten dagegen kein grünes Signal, da sie kein Flag-PatA exprimieren und dienten damit auch als Kontrolle für die Immunfluoreszenzfärbung. In nicht infizierten U937 Zellen waren nur die durch DAPI blau gefärbten Zellkerne zu erkennen, weshalb diese Proben als Negativkontrolle für die

Immunfluoreszenzfärbung fungierten. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass nach acht Stunden Infektionsdauer im Western Blot keine Expression des Flag-PatA-Proteins detektiert werden konnte. Außerdem wurden eher wenige Makrophagen, bei denen Flag-PatA an der Zytoplasmamembran beobachtet werden konnte, gefunden, obwohl sehr viele Zellen mit *L. pneumophila* JR32 (pPA99) infiziert waren und teilweise die Ausbildung eines Phagosoms erkennbar war. Bei einigen Proben, die aus verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen hervor gingen, trat teilweise auch ein unspezifischer grüner Hintergrund („Sternenhimmel“) in den mit Wildtyp infizierten Proben und auch den uninfizierten Proben auf. Eine Erhöhung der Verdünnung des Flag-spezifischen Primärantikörpers auf 1:2000 und 1:4000 bewirkte zwar eine Reduktion des Hintergrundes, jedoch konnte in diesen Fällen kein spezifisches grünes Flag-PatA-Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Neben einer Überexpression von Flag-PatA stand ein weiterer Vektor, pPA123 (pBCKS + 3 × Flag- $P_{patA}$ -*patA*), zur Verfügung, bei dem der native *patA*-Promotor mit dem Gen zusammen kloniert wurde. Dieser Vektor wurde in *L. pneumophila* JR32 und eine JR32  $\Delta dotB$ -Sekretionsmutante, die kein intaktes Typ IVB-Sekretionssystem mehr besitzt und PatA damit nicht mehr sekretieren kann, elektroporiert. Nach einer Kontrolle der Expression durch Einsatz von *Legionella*-Flüssigkulturen im Western Blot, durch die eine erfolgreiche Expression nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die Stämme für Infektionen von U937 Makrophagen genutzt.

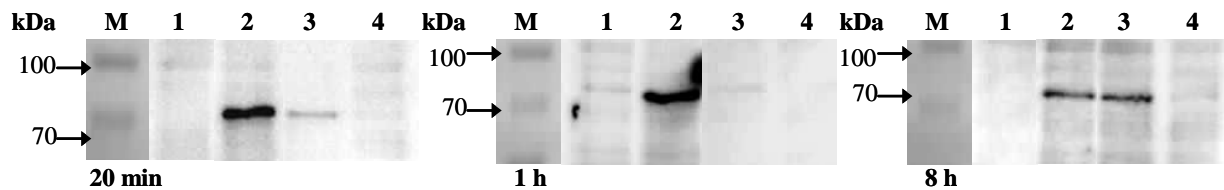
Insgesamt wurden fünf unabhängige Infektionen durchgeführt, aber nur in zwei Fällen konnte für den Stamm *L. pneumophila* JR32 (pPA123) ein grünes Flag-PatA-Signal an der Wirtszellplasmamembran beobachtet werden. In einem Fall betraf dies den Infektionszeitpunkt nach 20 min, in einem anderen Experiment konnte nach 8 h ein membranständiges Flag-PatA-Signal detektiert werden, während gleichzeitig sowohl die uninfizierte Kontrolle als auch die mit JR32 infizierten Zellen keine grünen Signale aufwiesen und das grün gefärbte Flag-PatA-Signal damit als authentisch eingestuft werden konnte (s. Abbildung 3.27). In den Infektionsproben der JR32  $\Delta dotB$ -Sekretionsmutante, die pPA123 exprimierte, konnte kein grünes Flag-PatA-Signal an der Zytoplasmamembran verzeichnet werden, da PatA nicht mehr sekretiert werden kann.



**Abbildung 3.27: U937 Makrophagen-Infektion mit *L. pneumophila* JR32, *L. pneumophila* JR32 (pPA123) und *L. pneumophila* JR32  $\Delta$ dotB (pPA123).** Das Einbringen des Vektors pPA123 (pBCKS + 3  $\times$  Flag- $P_{patA\_patA}$ ) in *L. pneumophila* JR32 ermöglichte eine native Expression von Flag-PatA, das nach Infektion von U937 Makrophagen (MOI 100) an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle lokalisiert. Legionellen wurden unter Verwendung von SDS mit polyklonalem *Legionella*-spezifischem Primärantikörper (1:300) und Alexa Fluor 594-konjugiertem *anti*-Kaninchen Sekundärantikörper (1:500) (rot) gefärbt. Flag-PatA wurde mit *anti*-Flag Primärantikörper (1:500) und Alexa Fluor 488-konjugiertem *anti*-Maus Sekundärantikörper (1:750) (grün) gefärbt. Als Kontrolle dienten U937 Zellen, die nur mit JR32 infiziert wurden oder nicht infizierte Zellen, bei denen nur der durch DAPI (blau) gefärbte Zellkern zu erkennen ist. Außerdem wurde pPA123 auch in einer JR32  $\Delta$ dotB-Sekretionsmutante exprimiert. Dargestellt sind die Infektionszeitpunkte nach 20 min und nach 8 h. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde in diesen Fällen SDS eingesetzt, da die Färbung bei voraus gegangenen Experimenten nicht zufriedenstellend war, d. h. auch in den Kontrollen grüne Signale auftraten, und beschrieben wurde, dass durch den Einsatz von SDS eine Uniformität der Färbung und verminderte Hintergrundfluoreszenz (243) sowie eine Erhöhung der Intensität der Färbung erreicht werden könnte (244). Außerdem wurde beschrieben, dass in einigen Fällen, Antigene ohne Vorbehandlung mit SDS nicht detektierbar sind (244). Mit dieser Methode konnten wie oben beschrieben in zwei Fällen authentische Flag-PatA-Signale detektiert werden, die im Gegensatz zu einer Überexpression des Proteins jedoch sehr schwach ausfielen. Auch hier trat das Problem auf, dass auf der einen Seite zwar sehr viele Zellen infiziert waren, aber nur bei wenigen davon ein spezifisches Signal für das Protein

detektiert werden konnte. Im Western Blot wurde für alle drei Infektionszeitpunkte der Expressionsnachweis für Flag-PatA erbracht (s. Abbildung 3.28).



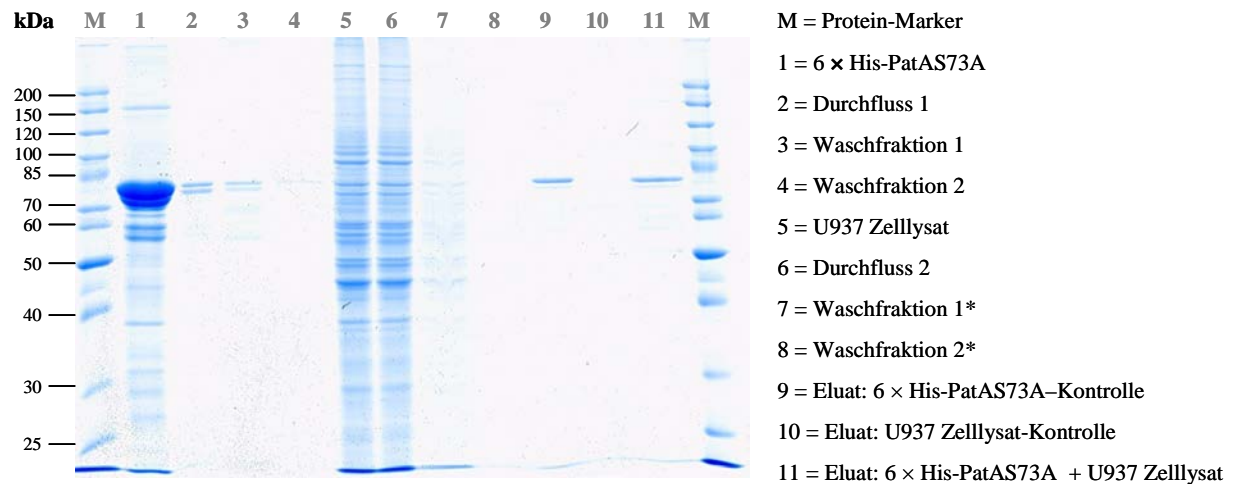
**Abbildung 3.28: Western Blot zur Kontrolle der Expression von Flag-PatA durch verschiedene *L. pneumophila* JR32- Mutanten während einer U937 Makrophagen-Infektion.** Spuren: M, Protein-Marker, 1, *L. pneumophila* JR32, 2, *L. pneumophila* JR32 (pPA123), 3, *L. pneumophila* JR32  $\Delta dotB$  (pPA123), 4, nicht infizierte U937 Makrophagen. Das Flag-PatA-Protein (Molekulargewicht 72 kDa) wurde bei allen drei Infektionszeitpunkten in mit JR32 (pPA123) und auch mit JR32  $\Delta dotB$  (pPA123) infizierten Makrophagen nachgewiesen. Als Kontrolle wurden mit JR32 Wildtyp infizierte Zellen und nicht infizierte U937 Makrophagen mitgeführt. Die Detektion erfolgte über den Flag-Tag durch einen spezifischen Flag-Tag-Antikörper und einen Maus-spezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Western Blots und der mikroskopischen Präparate zeigte jedoch, dass die Zellen in vielen Proben zerstört waren, d. h. sie wiesen massive Zellschädigungen auf, die sich in aufgeblähten, löchrigen Zellkernen und einem offensichtlichen Verlust der Zytoplasmamembranbarriere, da die Legionellen nicht intrazellulär sondern außerhalb der Zellen zu finden waren, äußerten. In allen fünf unabhängig voneinander durchgeführten Infektionsversuchen, die sich über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten erstreckten, traten unabhängig von der Färbemethode immer wieder ohne ein erkennbares Muster Proben mit zerstörten Zellen auf. Die Zellzerstörung war bereits vor der Fixierung erkennbar, d. h. sie muss schon während der Infektion aufgetreten sein. Am häufigsten war dieses Phänomen bei den frühen Infektionszeitpunkten nach 20 Minuten und einer Stunde, seltener aber auch nach acht Stunden zu verzeichnen. Davon am häufigsten betroffen waren die das Plasmid pPA123-tragenden *Legionella*-Mutanten. Auch der Einsatz von Plasmiden, die eine katalytisch-inaktive Variante des Flag-PatA-Proteins sowohl überexprimieren (pKS38 (pBCKS + 3  $\times$  Flag- $P_{mip\_patA\_S73A}$ )) als auch unter dem nativen Promotor exprimieren (pKS39 (pBCKS + 3  $\times$  Flag- $P_{patA\_patA\_S73A}$ )), bewirkte keine Lösung des Problems der Zellzerstörung. In den intakten Proben war kein eindeutiges Flag-PatA-Signal erkennbar und auch der Expressionsnachweis im Western Blot schlug fehl (Daten nicht gezeigt). Trotz partieller Bestätigung einer Lokalisation des Flag-PatA-Proteins an der Zytoplasmamembran in mit *L. pneumophila*-Mutanten infizierten U937 Makrophagen,

muss in einer abschließenden Betrachtung angemerkt werden, dass eine konkrete Aussage zur PatA-Lokalisation während der U937 Wirtszellinfektion unter den getesteten Bedingungen, auf Grund einer ungenügenden Verifizierbarkeit der Ergebnisse nicht getroffen werden kann.

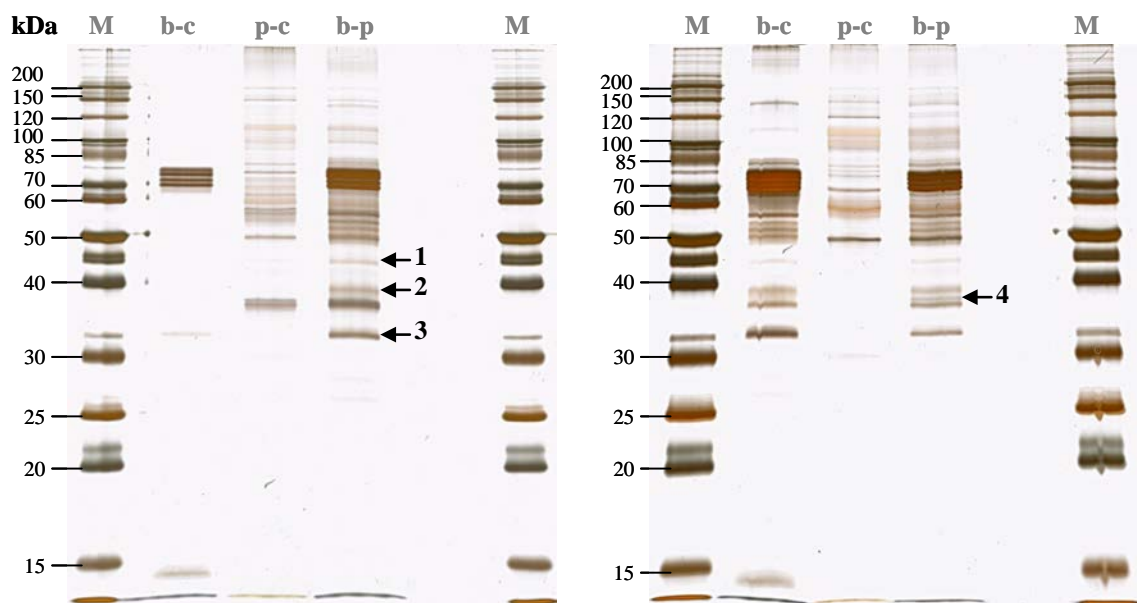
### 3.2.5 Suche nach eukaryotischen Interaktionspartnern von PatA

Bisher ist noch ungeklärt, welche Funktion dem PatA-Protein an der Zytoplasmamembran zukommt und ob eukaryote Faktoren dafür entscheidend sind bzw. beim Transport zur Zytoplasmamembran mitwirken. Da in der Zelle ein komplexes Netzwerk an Protein-Protein-Interaktionen vorliegt, dessen Dynamik dem Einfluss inter-, intra- und extrazellulärer Signale unterliegt, können sich Proteine temporär aneinander lagern und auch wieder auseinander gehen (245). Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob PatA mit spezifischen eukaryotischen Bindungspartnern der Wirtszelle interagiert, wurde die *in vitro*-Technik des Pull-Down Assay angewandt. Dafür wurde in *E. coli* exprimiertes, gereinigtes Polyhistidin (His<sub>6</sub>)-getaggtetes PatAS73A-Protein (s. Abb. 3.15) als „bait“- oder „Köder“-Protein an ein Kobalt-Chelat-Affinitäts-Harz immobilisiert und zur Identifikation putativer Protein-Bindungspartner aus Wirtszelllysaten („prey“- oder „Beute“-Zelllysaten) benutzt. Als Kontrollen dienten zum einen eine Probe, die nur das Wirtszelllysate enthielt, um falsch positive Banden, die durch unspezifische Bindung der Wirtspoteine an die Kobalt-Chelat-Matrix entstanden, zu eliminieren. Zum anderen diente das immobilisierte, gereinigte 6 × His-PatAS73A-Protein als Positivkontrolle zur Verifizierung einer effizienten Bindung des Proteins an die Affinitätsmatrix. Anschließend wurden Protein-Protein-Interaktionen durch SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie- und Silberfärbung visualisiert. Proteinbanden, die in den Kontrollen nicht auftraten, wurden als mögliche Interaktionspartner eingestuft. Der Pull-Down Versuch wurde mit Lysaten dreier *L. pneumophila*-spezifischer Wirtszelltypen, *Acanthamoeba castellanii*, U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen, in voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt (s. 2.2.14). Wie in Abbildung 3.29 beispielhaft für einen Assay mit U937 Makrophagenzelllysate gezeigt, wurden im Eluat der Probe, die 6 × His-PatAS73A-Protein und Wirtszelllysate enthielt (Spur 11), keine zusätzlich auftretenden Proteinbanden auf dem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel erkannt. Außerdem ist zu erkennen, dass das „Köder“-Protein 6 × His-PatAS73A an die Matrix gebunden hat und erfolgreich eluiert werden konnte, wie in Spur 9 zu sehen ist.



**Abbildung 3.29: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel zu einem Pull-Down Assay mit His<sub>6</sub>-PatAS73A und U937 Makrophagenzelllysatz.** Gereinigtes 6 × His-PatAS73A-Protein wurde mit U937 Zelllysatz für 17 h inkubiert. Es wurden keine zusätzlichen, in den Kontrollen nicht präsenten Proteinbanden identifiziert. Der Versuch wurde zweifach wiederholt.

Da vermutet wurde, dass die Konzentration möglicher mit PatA interagierender Proteine in einem komplexen Wirtszelllysatz-Proteingemisch sehr gering sein dürfte, könnten diese im Coomassie-gefärbten Gel möglicherweise nicht sichtbar sein. Deshalb wurden die Eluate gefällt und anschließend komplett auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Dieses Gel wurde einer Massenspektrometrie-kompatiblen Silberfärbung unterzogen, deren Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung höher ist und auch die Detektion sehr schwacher Proteinbanden möglich macht.



**Abbildung 3.30: Silber-gefärbtes SDS-PAGE Gel zu Pull-Down Assays mit His-PatAS73A und A549 Lungenepithelzelllysatz (links) bzw. U937 Makrophagenzelllysatz (rechts).** Gereinigtes 6 × His-PatAS73A-

Protein wurde mit A549 Zelllysate (links) oder U937 Zelllysate (rechts) für 17 h inkubiert. Das gesamte Eluat wurde konzentriert und komplett aufgetragen. Die Silberfärbung erfolgte mit dem *FireSilver* Kit (Proteome Factory). Spuren: M, Protein-Marker, b-c, „bait“-Kontrolle ( $6 \times \text{His-PatAS73A}$ ), p-c, „prey“-Kontrolle (A549- bzw. U937-Zelllysate), b-p, „bait“ + „prey“ =  $6 \times \text{His-PatAS73A}$ -Protein + Wirtszelllysate. (2 Wiederholungen) Die mit Pfeilen markierten Banden traten in den Kontrolle nicht auf und wurden deshalb ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Für die Experimente, die mit A549 Zelllysate und U937 Zelllysate durchgeführt wurden, konnten zusätzliche, in den Kontrollen nicht präsente Proteinbanden detektiert werden (s. Abbildung 3.30). Im Gegensatz dazu erbrachte der mit *A. castellanii* durchgeführte Pull-Down Assay keine in dieser Hinsicht auffälligen Proteinbanden (Daten nicht gezeigt). Diese durch Pfeile markierten Proteinbanden bei ca. 45 kDa (1), 39 kDa (2), 33 kDa (3) im Assay mit A549 Zelllysate und eine Bande bei ca. 38 kDa (4), die aus dem Versuch unter Verwendung von U937 Makrophagenzelllysate resultiert, wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse versandt.

Die massenspektrometrische Analyse der ausgewählten Proteinbanden ergab, dass es sich bei allen vier Proteinen um PatA handelt. Neben der Identifikation von PatA mit einem „Protein Score“ zwischen 1074 und 684, wurden mit einem wesentlich niedrigeren „Protein Score“ zusätzliche humane Proteine identifiziert. Im Fall von Proteinbande Nr. 1 waren dies ein unbekanntes humanes Protein (gi|28317), das ein Molekulargewicht von 60 kDa besitzt, mit einem „Score“ von 287 und *beta*-Aktin (gi|28336), das ein Molekulargewicht von 42 kDa besitzt, mit einem Wert von 258. In der Probe mit der ausgeschnittenen Proteinbande Nr. 4, die aus dem Pull-Down Assay mit U937 Makrophagenzelllysate stammte, wurde mit einem geringen „Protein Score“ von 165 zusätzlich zu PatA noch die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (gi|31645) aus *Homo sapiens* mit einem Molekulargewicht von 36 kDa angegeben. Zumindest im Fall von *beta*-Aktin und der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase stimmen die Größen der Proteine annähernd mit den auf den Silbergelen detektierten Banden überein. Aufgrund der sehr geringen „Protein Scores“ sind dies jedoch nur Hinweise auf mögliche interagierende Proteine, die in weiteren Experimenten bestätigt werden müssten.



## 4 Diskussion

### 4.1 Identifikation neuer Hämolyse-assoziiierter *Legionella* Gene

#### 4.1.1 Bewertung des Agarplatten-basierten *Screening*-Verfahrens für die Identifikation neuer zytolytischer Faktoren von *Legionella pneumophila*

Zur Identifikation neuer zytolytisch wirkender Proteine des Lungenpathogens *L. pneumophila* wurde eine Transposon (Tn5)-mutagenisierte Klonbank der Stämme JR32 und Corby mit Hilfe der *Screening*-Medien *Legionella*-Humanblutagar, -Eigelbagar und -Caseinagar auf hämolytische, lipolytische und proteolytische Aktivitäten der Mutanten untersucht. Die in *L. pneumophila* hergestellte Insertionsmutantenklonbank bietet im Vergleich z. B. mit einer heterologen Expressionsklonbank in *Escherichia coli* oder anderen Mikroorganismen den Vorteil, dass der Einfluss der Mutation direkt im Organismus sichtbar ist und auch regulatorisch-wirkende Gene identifiziert werden können. Ebenso können Proteine identifiziert werden, die durch *Legionella*-eigene Faktoren posttranslational aktiviert oder modifiziert werden müssen, was vor allem für hydrolytische Proteine zum Schutz des Bakteriums von Bedeutung ist. Des Weiteren kann der mögliche Einschluss heterolog exprimierter Proteine in *Inclusion Bodies* ausgeschlossen werden. Andererseits können mit diesem Verfahren für den Mikroorganismus essentielle Gene höchstwahrscheinlich nicht identifiziert werden, da eine Mutation in diesen Genen einen generellen Wachstumsdefekt der Mutante zur Folge hat. Ein weiterer Nachteil des Insertionsmutanten-*Screenings* ist die Zuordnung eines bestimmten Effektes oder Phänotyps zu einem Gen bzw. dessen codiertem Protein, wenn dieses Gen in einer Operonstruktur mit anderen Genen vorliegt. Hiefür müsste dann eine detaillierte Funktionsanalyse aller Gene des putativen Operons durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der zuvor genannten Detektionsagarplatten insgesamt 1152 Klone des Stammes *L. pneumophila* JR32 *gescreent*, von denen 27 Klone Bezug nehmend auf den Wildtyp ein abweichendes Lyseverhalten zeigten. Innerhalb der Gruppe dieser Mutanten besaßen 17 ein reduziertes Hämolyseverhalten, ein Klon wies zusätzlich noch geringere lipolytische Aktivität auf und ein anderer Klon dieser Gruppe fiel durch reduziertes lipolytisches als auch proteolytisches Verhalten auf. Zehn Mutanten von *L. pneumophila* JR32 zeigten dagegen eine stärkere Hämolyse als der Wildtyp. Durch ein *Screening* von insgesamt

910 Mutanten des Stammes *L. pneumophila* Corby konnten 13 Klone mit reduzierter sowie 10 Klone mit verstärkter hämolytischer Aktivität gegenüber dem Wildtyp identifiziert werden. Eine dieser Mutanten besaß zusätzlich noch eine verringerte lipolytische Aktivität. Ebenso wurde eine Corby-Mutante identifiziert, die auf den Agarplatten kein detektierbares hämolytisches, proteolytisches und lipolytisches Verhalten zeigte, was in einer Transposoninsertion im Gen für die Zink-Metalloprotease ProA begründet lag. Das Auffinden dieser *proA*-Mutante ist ein Hinweis auf die Wirksamkeit des *Screens* für die Identifikation zytolytischer Faktoren, da bereits bekannt ist, dass eine Mutation im *proA*-Gen zur Reduktion von Hämolyse, Lipolyse und Proteolyse führt (115). Allerdings wurden keine weiteren bekannten *Legionella*-Phospholipasen mit hämolytischer Aktivität wie z. B. PlaB oder bekannte Hämolsine wie Legiolysin gefunden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass durch die begrenzte Anzahl *gescreenter* Mutanten keine vollständige Abdeckung des Genoms gewährleistet war, zum anderen können mögliche Einflüsse einer Insertion unter Umständen nicht detektiert werden, da sie entweder funktionell kompensiert werden durch die Wirkung anderer Proteine, was vor allem für putativ neue lipolytische Proteine auf Grund des Vorhandenseins einer Vielzahl anderer bereits bekannter Phospholipasen von *L. pneumophila* zutreffen könnte, oder sie in ihrer Wirkung zu gering sind.

#### 4.1.2 Beispiele neuer putativ Virulenz-assoziiierter Gene

Neben einigen Genen für hypothetische Proteine waren metabolische bzw. Metabolismus-assoziierte Gene, regulatorische Gene und Virulenz-assoziierte Gene von einer Transposoninsertion betroffen und wurden während des *Screenings* auf zytolytische Faktoren von *L. pneumophila* identifiziert. Beim Stamm Corby waren in diesem Zusammenhang z. B. die Metabolismus-assoziierten Gene *lpc1023*, codierend für die Enoyl-CoA Hydratase, die beim Abbau von Fettsäure-Acyl-CoA während der  $\beta$ -Oxidation beteiligt ist (211) und *lpc3266*, codierend für eine Cystathionin *beta*-Synthase, ein Pyridoxal-Phosphat-abhängiges Enzym mit einer Häm-Gruppe, das die Kondensation von Serin und Homocystein zu Cystathionin katalysiert, betroffen (222). Pyridoxal-Phosphat-abhängige Enzyme wurden als katalytische Proteine, die hauptsächlich in elementaren metabolischen Prozessen beteiligt sind, beschrieben (246). Interessant war auch eine Transposoninsertion im Gen für LvrA (*Legionella vir*(ulence) *region*), das auf einer DNA-Insel innerhalb des *Legionella*-Genoms, die einen höheren GC-Gehalt im Vergleich zum Rest des Chromosoms besitzt, zwischen *lvh* (*Legionella vir homologues*)-Genen lokalisiert ist (121). Diese Gene codieren für das Lvh-

Typ IV-Sekretionssystem, das für die intrazelluläre Vermehrung in *A. castellanii* als entbehrlich eingestuft wurde, aber möglicherweise Komponenten des Dot/Icm-Systems ersetzt und in den Prozess der bakteriellen Konjugation involviert ist (121, 212). Da der *lvh*-Locus vorwiegend in *L. pneumophila* Stämmen, die im Menschen Krankheit hervorrufen, präsent ist, wurde eine Rolle für die Pathogenität dieses Locus vermutet. LvrA ist außerdem homolog zu CsrA, ein Repressor der Aktivitäten wie den DNA-Transfer während der transmissiven Phase inhibiert und replikatorische Prozesse aktiviert und deshalb als ein potentiell Virulenz-assoziiierter Faktor einzustufen ist (247, 248). Auch das während des Screenings identifizierte Ankyrin repeat-containing Protein LegA1 könnte so ein Faktor sein, da bakterielle Proteine mit Ankyrin-repeat Homologie-Domänen in *L. pneumophila* und auch *Coxiella burnettii* über ein Typ IV-Sekretionssystem in die eukaryotische Wirtszelle sezerniert werden um dort Wirtsfunktionen durch molekulare Mimikry zu beeinflussen oder die Funktion eukaryotischer Effektoren zu stören. Das AnkX-Protein von *L. pneumophila* stört zum Beispiel den Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransport, um eine Fusion der LCV mit Endosomen während einer Makrophageninfektion zu verhindern (213).

Für den Stamm *L. pneumophila* JR32 wurden im Zusammenhang mit diesem Screen ebenfalls Transposoninsertionsorte in Metabolismus-assoziierten Genen identifiziert. Ein Beispiel dafür ist die Aldehyd-Dehydrogenase, ein Enzym das die im Intermediärmetabolismus entstehenden toxischen Aldehyde beim Abbau von Ethanol über Azetaldehyd zu Azetat oxidiert. Da beim Alkohol-Metabolismus eine große Menge Acetyl-CoA anfällt, das zur Synthese von Lipiden genutzt werden kann, könnte sich in der Folge eine Erhöhung der Membranfluidität ergeben, falls vermehrt ungesättigte Fettsäuren gebildet würden und eine Inkorporation dieser in Phospholipide stattfinden würde (249). Des Weiteren wurde für das *aldA*-Gen in *Vibrio cholerae* beschrieben, dass es das erste Beispiel für ein Gen codierend für ein zytoplasmatisches Protein ist, das unter Kontrolle von ToxR, dem Cholera-Toxin Transkriptions-Aktivator, steht und damit die Vermutung, dass metabolische Enzyme neue Mitglieder von Virulenz-Regulons in Bakterien darstellen könnten, aufgestellt (250). Ebenso wie für den Stamm Corby wurde auch für JR32 ein Gen identifiziert, das im erweiterten Sinne eine wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus spielt. Die Methylcitrat-Dehydratase PrpD stellt ein Enzym des Methylcitrat-Zyklus dar, der essentiell für den Propionat-Metabolismus in *Mycobacterium tuberculosis* ist (214). Propionyl-CoA fällt wiederum bei der  $\beta$ -Oxidation von ungeraden Fettsäurekettenlängen als zusätzliches Produkt an und wird u. a. im Rahmen des Methylcitrat-Zyklus zu Pyruvat oxidiert (215, 216). Interessant war auch die Tn5-

Insertion im Gen *lpg0645* einer hämolytisch-vermindert aktiven Mutante. Dieses konservierte Gen codiert für ein hypothetisches Protein, bei dem es sich laut NCBI um ein verkürztes RtxA-Protein handeln könnte. Es wurde bereits beschrieben, dass dieses Protein in *L. pneumophila* Philadelphia durch zwei ORFs, *lpg0644* und *lpg0645*, codiert wird (251). RtxA wurde im Rahmen eines Screenings auf Mutanten, die den Phänotyp eines verstärkten Eintritts in die Wirtszelle zeigten, gefunden (52). Neben seiner Bedeutung für den Eintritt der Bakterien in die Wirtszelle, spielt das Protein auch eine wichtige Rolle für die Adhärenz, Zytotoxizität und Porenformation der Pathogene. Cirillo und Mitarbeiter zeigten in einer Studie sowohl eine verminderte Replikationsfähigkeit einer *rtxA*-Mutante in Monozyten als auch eine verringerte Virulenz im Mausmodell (51). Die Rolle des *rtxA*-Gens für die Prozesse Adhärenz und Eintritt in die Wirtszelle sowie eine Beteiligung am Prozess des intrazellulären Überlebens und im Transport, wurde auch in *Acanthamoeba castellanii* bestätigt (252). Weiterhin wurden innerhalb der *rtx*-Gene u. a. Domänen wie eine *haemolysin calcium-binding site* beschrieben, die in Verbindung mit der Adhärenz an Wirtszelloberflächen, Vakuolenmembranen und Porenformation steht und damit zum hämolytischen Potential beiträgt (251, 253, 254).

Eine Transposon-Mutante des Stammes Corby zeigte sowohl auf den Humanblutagarplatten als auch im Flüssighämolysetest ein erhöhtes Potential humane Erythrozyten zu lysieren. Die Transposoninsertion dieser Mutante XVIII F12 betraf das Gen *yrfl* (*lpc3104*), welches für das Hitzeschockprotein 33 (Hsp33) codiert. Der Nachweis, dass dieses Gen nicht mehr exprimiert wurde, wurde durch RT-PCR erbracht. Hsp33 wurde in *E. coli* als ein ATP-unabhängiges Chaperon beschrieben, das eine Vielzahl zellulärer Proteine binden und deren irreversible Aggregation unter zellulären Stressbedingungen verhindern kann (255). Diese Stressbedingungen stellen für Hsp33 reaktive Sauerstoffspezies ( $H_2O_2$ ) bei erhöhten Temperaturen dar, die eine Aktivierung des redox-regulierten Chaperons bewirken (256). Hsp33 ist ein Hitzeschockprotein, das in einer Vielzahl prokaryotischer Spezies präsent ist. Mehr als 30 verschiedene Hsp33-Homologe, die alle ein konserviertes Cystein-Motiv in der Nähe des C-terminalen Proteinbereiches aufweisen, wurden bereits identifiziert (257). Diese Tatsache und der hohe Grad an Konservierung suggerieren, dass Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle in einer Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse spielen (258). Oxidative Stressbedingungen könnten für *L. pneumophila* vor allem während der intrazellulären Replikation im Phagosom eine Rolle spielen. In einer Transkriptomanalyse-Studie von Jules und Buchrieser wurde vermutet, dass in der späten replikativen Phase einer Infektion von *A.*

*castellanii* eine Sauerstofflimitation, die vermutlich auf die hohe Konzentration von *L. pneumophila*-Zellen innerhalb des Phagosoms zurück zu führen ist, auftritt, da eine für Sauerstoff hoch affine D-Typ Cytochrom-Oxidase (*qxtAB*) verstärkt exprimiert wird (259). Dies suggeriert, dass Hitzeschockproteine auch für *L. pneumophila* von Bedeutung sind. Zu den allgemeinen zytoprotektiven Funktionen der Hitzeschockproteine gehören die Proteinfaltung in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten, die Instandhaltung struktureller Proteine, eine Rückfaltung missgefalteter Proteine, die Translokation von Proteinen durch Membranen in verschiedene zelluläre Kompartimente eukaryotischer Zellen, die Verhinderung der Aggregation von Proteinen und die Degradation nicht-stabiler Proteine (zusammengefasst in (258)). Es existiert kein unmittelbarer Beweis, ob HSPs zu den Virulenzfaktoren gehören, aber ihre Expression wird möglicherweise mit der von Virulenz-assoziierten Genen koordiniert wie von Buchmeier und Heffron vorgeschlagen (260). In *L. pneumophila* wurde in diesem Zusammenhang bereits ein immundominantes Antigen, ein Hsp60, das im Periplasma und an der Bakterienoberfläche lokalisiert ist und die Prozesse der Anheftung und Invasion in HeLa-Zellen und Makrophagen fördert sowie möglicherweise auch in den Prozess der Fusion des Phagosoms mit Lysosomen in einem frühen Stadium eingreift, charakterisiert (261). In avirulenten *L. pneumophila* Stämmen mit definierten Mutationen in *dot/icm*-Genen kann Hsp60 nicht mehr an deren Oberfläche lokalisiert werden und auch die Fähigkeit der Invasion von HeLa-Zellen ist 1000-fach reduziert. Diese Verknüpfung der HSPs mit der Pathogenität und Immunität tritt auch bei *Helicobacter pylori* auf, wo Hsp60 und Hsp70 die Anheftung an Magenepithelzellen vermitteln (261) und scheint damit in vielen Pathogenen verbreitet zu sein.

Zu den Substraten von Hsp33 aus *E. coli* gehören neben Metabolismus-assoziierten Enzymen wie der Aconitase B auch Proteine wie die  $\beta$ -Ketoazyl-Azyl-Carrier Protein Synthase I, die in den Prozess der Fettsäure-Biosynthese involviert ist und Proteine, die für die Transkription (Rho) und für Zellteilungsprozesse eine Rolle spielen (255). Da eine Transkription von Hsp33 in der *L. pneumophila* Tn5-Mutante nicht mehr nachweisbar war, ist es möglich, dass die zelluläre Schutzfunktion für zuvor genannte Proteine wegfällt, was Änderungen im Metabolismus und indirekte Effekte auf das hämolytische Potential zur Folge gehabt haben könnte. Weiterhin werden unter oxidativen Stressbedingungen neben molekularen Chaperonen auch Proteasen exprimiert, die Proteine degradieren (262). Da Hsp33 in der Mutante möglicherweise nicht mehr gebildet wird, könnten dafür verstärkt Proteasen exprimiert werden, die zu einer verstärkten Hämolyse führen könnten. Da HSPs allgemein an

einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, ist auch eine Interaktion mit Phospholipasen oder anderen Hämolyse-assoziierten Faktoren vorstellbar. Die mögliche regulatorische Rolle von Hsp33 auf diese Faktoren könnte in der Mutante wegfallen, was in einer Erhöhung des hämolytischen Potentials resultieren könnte. Allerdings ist die hämolytische Aktivität der Mutante nur gering erhöht. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Hsp33 wie bei *E. coli* nur unter Stressbedingungen aktiv ist (255). In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Assays treten möglicherweise keine derartigen Stressbedingungen auf, so dass Hsp33 eine untergeordnete Rolle spielen würde und auch ein Wegfall keine größeren Konsequenzen hätte. Ein anderer Grund könnte eine Kompensation der Funktion von Hsp33 durch andere Proteine sein. In *E. coli* wurde vermutet, dass sich Hsp33 und DnaK, ein effizientes molekulares Chaperon, auf Grund teilweise überlappender Substratspezifitäten kompensieren (255). Da auch *L. pneumophila* ein *dnaK*-Gen (lpg2025) besitzt, besteht die Möglichkeit, dass das molekulare Chaperon DnaK die Funktion von Hsp33 kompensieren könnte.

#### **4.1.3 Charakterisierung von *L. pneumophila*-Mutanten mit Insertionen in Aminosäure-Metabolismus-assoziierten Genen und verändertem hämolytischen Phänotyp**

Für die *L. pneumophila* JR32 Mutante XXIII A5, die während des *Screenings* durch den Phänotyp einer verstärkten Hämolyse sowie verringerte Pigmentbildung auffiel, konnte eine Tn5-Insertion im *aroC*-Gen (lpg2303), das für die Chorismatsynthase codiert, ein im Shikimat-Syntheseweg involviertes Enzym für die Synthese von Chorismat, das wiederum ein Vorläufermolekül für die Generierung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, *para*-Aminobenzoat (Folatbiosynthese) und weiterer Produkte für die Synthese von Siderophoren, Ubiquinonen und Menaquinonen darstellt (263), identifiziert werden. Das *aroC*-Gen wurde bereits in einem Transposon-Insertionsmutanten-*Screening* in *Francisella tularensis* subsp. *novicida* identifiziert, mit dem für die pulmonare und systemische Infektion in Mäusen benötigte Gene gesucht wurden (264). *F. tularensis* ist ein gram-negatives, fakultativ intrazelluläres Pathogen, das hauptsächlich Makrophagen infiziert und sich in diesen repliziert (265), aber in der Umwelt auch in Amöben überlebt und sich repliziert (266, 267) und damit Gemeinsamkeiten zu *L. pneumophila* aufweist. Auch in *F. tularensis* werden Virulenz-Regulatoren durch ppGpp gesteuert und schaffen so eine Verbindung zwischen Pathogenese und Metabolismus (268). Durch die Entwicklung Genom-umfassender genetischer *Screens* wurden hunderte für die Virulenz von *F. tularensis*

bedeutsame Gene identifiziert, von denen ein großer Teil für Funktionen in Zusammenhang mit Metabolismus und Ernährung codiert. Vor allem solche, die für die Deckung der Kohlenhydrat- und Aminosäure-Bedürfnisse dieses Pathogens eine Rolle spielen, standen dabei im Fokus (265). Neben dem Gen für die Chorismat-Synthase wurde fast jedes Gen des Biosyntheseweges für aromatische Aminosäuren in Mutanten-*Screenings* auf reduzierte Virulenzeigenschaften identifiziert, was sowohl die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für die Virulenz von *F. tularensis* hervorhebt, als auch ein Hinweis darauf ist, dass der verfügbare „Pool“ an aromatischen Aminosäuren in der infizierten Wirtszelle limitiert zu sein scheint. Interessant ist auch, dass einige dieser Gene *in vivo* auch für das Wachstum und die Virulenz in *Drosophila melanogaster* als wichtig eingestuft wurden und damit auch übergreifend in „Nicht-Säuger-Modellen“ eine Rolle spielen (269). Auf der bakteriellen Seite der Forschung wurde die essentielle Bedeutung des Biosyntheseweges aromatischer Aminosäuren für die bakterielle Virulenz durch Bruce Stockers Pionierarbeit zur Genetik von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) demonstriert (265). Mutationen in verschiedenen Genen, die für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren codieren, wurden dazu benutzt, die Virulenz von *Salmonella*-Stämmen zu reduzieren und verschiedene Tier-Spezies zu immunisieren (270, 271). Die Attenuierung der *S. Typhimurium aro*-Mutanten wurde durch die Unfähigkeit des Bakteriums, *para*-Aminobenzoat und Dihydroxybenzoat aus Chorismat zu generieren, erklärt (272). Dies könnte auch für die *L. pneumophila aroC*-Mutante der Fall sein.

Das sogenannte „*Browning*“ der *Legionella*-Kulturen, das im Falle der *aroC*-Mutante deutlich vermindert ist, ist im Wesentlichen auf die Bildung von Legiolysin (Lly) zurück zu führen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von Legiolysin auf einem Plasmid in rekombinanten *E. coli* K-12 Klonen zu einem hämolytischen Phänotyp und zur Bildung eines melaninartigen Pigments sowie zu Fluoreszenz führt. Weiterhin zeigt die DNA-Sequenz des *lly*-Locus Homologie zu Genen, die für Enzyme codieren, welche zur Pigmentbildung führen und an der Degradation aromatischer Aminosäuren in *Shewanella colwelliana* und *Pseudomonas spp.* beteiligt sind (273, 274). Außerdem wurde beschrieben, dass die Pigmentproduktion in *Legionella* und Lly-exprimierenden *E. coli* Klonen in mit L-Tyrosin supplementierten Kulturmedien signifikant erhöht ist (275, 276). Das Vorhandensein eines anderen ORFs in der Genumgebung des *lly*-Locus, der starke Homologie zum Enzym Phenylalanin-Dehydrogenase aufweist, unterstützt zusätzlich die Hypothese, dass das Lly-Protein an der Degradation aromatischer Aminosäuren beteiligt ist (277). Wintermeyer und

Mitarbeiter vermuteten, dass der *lly*-Locus Teil einer Operonstruktur ist, in der mehrere Gene, codierend für Enzyme, die Reaktionen zur Umwandlung aromatischer Aminosäuren in andere Substrate katalysieren, vorhanden sind. Interessant ist auch der Fakt, dass eine *lly*-negative *L. pneumophila* Philadelphia-1 Mutante zwar kein Pigment mehr bildet, der hämolytische Phänotyp jedoch nicht beeinträchtigt ist, was auf eine Kompensation durch andere Faktoren zurückgeführt werden könnte (277). Im Falle der *L. pneumophila* JR32 *aroC*-Mutante, die aufgrund ihrer verstärkten hämolytischen Aktivität und einer verringerten Pigmentbildung gegenüber dem Wildtyp auffiel, könnte es durch eine mögliche Verringerung der Bildung aromatischer Aminosäuren auch zu einer verringerten Legiolysinbildung kommen, da das *lly*-Gen unter den herrschenden Nährstoffbedingungen eventuell herunter reguliert werden könnte. Dies widerspricht zwar dem verstärkten Hämolysephänotyp, dieser könnte jedoch dadurch erklärt werden, dass unter den depletierten Nährstoffbedingungen, d. h. einem Mangel an aromatischen Aminosäuren, eine Verschiebung auf Höhe der Genexpression bzw. deren Regulation erfolgt und andere hämolytisch wirkende Faktoren verstärkt exprimiert werden. Ebenso könnte die Mutation im *aroC*-Gen zu einer verringerten Bildung von Chorismat führen, womit ein wichtiger Präkursor für die Bildung von Siderophoren fehlen würde. Man könnte sich auf Grund dessen einen komplexen Regulationsmechanismus vorstellen, der die fehlenden Eisenaufnahme-Systeme und den damit verbundenen Eisenmangel über die Induktion hämolytisch wirkender Faktoren zu kompensieren versucht, um eine Nutzung des Eisens aus den Blutzellen möglich zu machen.

Im Umkehrschluss zeigte die *L. pneumophila* Corby *pabB*-Mutante (Tn5-Insertion in *lpc0979*) den Phänotyp einer verminderten Hämolyse. Das Enzym *para*-Aminobenzoatsynthase ist in die Folatbiosynthese involviert und katalysiert den ersten Reaktionsschritt der Konversion von Chorismat über ein Zwischenprodukt zu *para*-Aminobenzoat (PABA) (220). Deshalb kann eine mögliche Anhäufung von Chorismat vermutet werden. Für die Bildung von Siderophoren würden damit genügend Vorläufermoleküle zur Verfügung stehen. Das Bakterium wäre möglicherweise nicht auf eine zusätzliche Akquise von Eisen aus Blutzellen angewiesen und könnte die Expression von Genen für hämolytisch wirkende Faktoren vermindern.

Da das *pabB*-Gen (*lpc0979*) sich um 13 Basenpaare mit dem in gleicher Orientierung liegenden Gen *lpc0978*, das für ein MutT Nudix *family protein* codiert, überlappt, wurde vermutet, dass beide Gene eine Operonstruktur bilden könnten. Diese Coenzym A



Pyrophosphatase (CoAse), ein Mitglied der Nudix Hydrolase-Superfamilie, katalysiert die Elimination von oxidiertem und damit inaktivem Coenzym A (CoA), das CoA-verwertende Enzyme inaktivieren kann. CoAsen werden vor allem unter oxidativen Stressbedingungen benötigt, wie sie für das intrazelluläre Pathogen *L. pneumophila* bereits beschrieben wurden. CoA wiederum spielt eine zentrale Rolle im Lipid Metabolismus, da es z. B. im Zytosol in die initialen Schritte der Fettsäuresynthese involviert ist, in den Mitochondrien eine Rolle im Citrat-Zyklus spielt und bei der Oxidation von Fettsäuren auch in den Peroxisomen beteiligt ist. Dabei fällt CoA die wichtige Rolle zu, Fettsäuren für deren weitere Modifikation in biologische „Schlüssel“-Signalmoleküle zu aktivieren (222). Da durch RT-PCR jedoch eine Expression von *lpc0978* jedoch nicht von *pabB* nachgewiesen wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass nur die Expression von *pabB* durch die Insertion betroffen war. Dies muss jedoch eine mögliche Operonstruktur nicht zwangsläufig ausschließen.

Ein Beispiel für die Bedeutung der Folatbiosynthese im Rahmen der Virulenzausprägung eines Pathogens, liefert ein im Boden lebendes Pflanzenpathogen. Aufgrund einer Tn5-Insertion im *pabB*-Gen von *Ralstonia solanacearum* verlor dieses Bakterium die Fähigkeit sowohl in Interzellularräumen zu proliferieren, als auch dessen systemische Infektivität und Virulenz in Tabakpflanzen (278). Auch in einem Mutagenese-Screen, durchgeführt in *Burkholderia pseudomallei*, ein gram-negatives, fakultativ intrazelluläres Pathogen für Tiere und Menschen, das nach Infektion eine Sepsis auslösen kann, wurden Virulenz-attenuierte Mutanten identifiziert. Diese waren auxotroph für Aminosäuren wie Leucin und Threonin sowie für *para*-Aminobenzoat, besaßen u. a. Insertionen in Genen wie *aroB* (Chorismat-Biosynthese) und waren damit auxotroph für aromatische Aminosäuren (279). Die *aroB*-Mutante besaß einen starken Wachstumsdefekt in Minimalmedium, der nur durch die kombinierte Zugabe von Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, *para*-Aminobenzoat und 2,3-Dihydroxybenzoat, nicht jedoch durch die Einzelkomponenten wieder hergestellt werden konnte (279). Auxotrophe Mutanten wurden bereits als effektive, lebende aber attenuierte Vakzinkandidaten für viele bakterielle Spezies wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella melitensis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *S. Typhimurium* beschrieben (272, 280-282). Eine andere *B. pseudomallei*-Mutante, besaß eine Transposoninsertion in einem putativen *pabB*-Gen, was in einem Wachstumsdefekt in Minimalmedium und einer schwerwiegenden Attenuierung im BALB/c Mausmodell resultierte. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Mutante zusätzlich einen Eisenaufnahmedefekt und reduzierte Fähigkeiten im Hinblick auf das intrazelluläre Wachstum aufwies (283). Diese Beobachtung deckt sich

mit der in dieser Arbeit festgestellten verminderten intrazellulären Replikationsfähigkeit der *L. pneumophila* Corby *pabB*-Mutante im Amöbenmodell. Die Attenuierung dieser Mutante konnte im Infektionsmodell mit *Acanthamoeba castellanii* jedoch durch *trans*-Komplementation nicht aufgehoben werden, wobei eine fehlende Transkription des auf dem Plasmid eingefügten Gens durch RT-PCR ausgeschlossen werden konnte. Dabei scheint die Komplementation intrazellulärer Replikationsdefekte von *L. pneumophila* durch extrachromosomale Vektoren ein generelles Problem zu sein. Durch Reintegration einer intakten Kopie des *pabB*-Gens ins Genom der Mutante konnte zwar die Fähigkeit zur Hämolyse annähernd auf das Niveau des Wildtyps wiederhergestellt werden, der Infektionsdefekt in *A. castellanii* blieb jedoch erhalten. Eine mögliche Ursache dafür könnten *Second Site*-Mutationen, z. B. in für die Kolonisation und intrazelluläre Vermehrung essentiellen Genen, zu denen Gene des Typ IVB-Sekretionssystem zählen, sein (137). Da in der Amöbeninfektion zwei verschiedene Komplementanten getestet wurden, die beide keine Wiederherstellung der intrazellulären Replikation auf das Niveau des Wildtyps erreichen konnten, scheinen noch andere unbekannte Ursachen für dieses Phänomen eine Rolle zu spielen.

#### 4.1.4 Bedeutung des Aminosäurestoffwechsels von *L. pneumophila* - Überlegungen zum Thema Metabolismus und Virulenz

Die Tatsache, dass in diesem *Screen* zwei Transposonmutanten mit Insertionen in den Genen *aroC* und *pabB*, deren Enzyme metabolisch direkt miteinander verknüpft sind, gefunden wurden, ist ein Hinweis auf eine mögliche Verknüpfung des Aminosäurestoffwechsels mit der Virulenz von *L. pneumophila* und hebt die Wichtigkeit dieser Stoffwechselwege für dieses intrazelluläre Pathogen hervor. *L. pneumophila* nutzt Aminosäuren als primäre Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle (284-286). Bei einer Analyse von zehn *L. pneumophila* Stämmen auf für das Wachstum auf einem chemisch definierten Medium (287) benötigte Aminosäuren wurden Arginin, Cystein, Isoleucin, Leucin, Threonin, Valin, Methionin und Phenylalanin oder Tyrosin, die sich gegenseitig ergänzen können, identifiziert (284). Aufgrund der Nährstofflimitation, die während der intrazellulären Replikation auftritt, erfolgt bei Legionellen ein Wechsel von einer replikativen in eine transmissive Phase, die mit der verstärkten Expression von Virulenzfaktoren einher geht. Um Expressionsprofile bakterieller Pathogene und deren Wirtszellen zu erfassen, werden seit nicht allzu langer Zeit *Microarrays* als wichtige molekularbiologische Werkzeuge genutzt. Die Voraussetzung dafür schuf die

vollständige Genomsequenzierung der zu untersuchenden Organismen (259). Durch eine transkriptionelle Analyse von *L. pneumophila*-Genen, die während einer Amöbeninfektion verstärkt abgeschrieben werden, konnten u. a. Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren, welche in metabolische Prozesse involviert sind. Unter den Genen, die während einer Amöbeninfektion in der replikativen Phase verstärkt exprimiert werden, befinden sich unter anderem solche, die speziell für den Katabolismus und die Aufnahme von Aminosäuren, vor allem von Serin, Threonin, Alanin, Glycin, Tyrosin und Histidin, eine wichtige Rolle spielen (67). Der Threonin-Transporter PhtA (*phagosomal transporter*) wurde ebenfalls in Makrophagen als essentiell für die Differenzierung und Proliferation von *L. pneumophila* beschrieben (288). Eine aktuelle *L. pneumophila* Transkriptomstudie von Faucher und Mitarbeitern bestätigte ebenfalls eine starke Induktion der Expression von Genen für Aminosäure- und Oligopeptidtransporter während der intrazellulären Multiplikation in Makrophagen (289). Die Induktion von Genen für den Aminosäuretransport wurde auch während des intrazellulären Wachstums von *Yersinia pestis*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhi, *Shigella flexneri* und *Bacillus anthracis* beobachtet (290-294), eine Tatsache, die noch einmal die Bedeutung dieser Gene für (fakultativ) intrazelluläre Pathogene hervorhebt. Auch eine verstärkte Expression einiger Aminopeptidase- und Protease-codierender Gene während der replikativen Phase der Amöbeninfektion wurde beschrieben, was auf eine mögliche Akquise von Aminosäuren des Wirtes durch *L. pneumophila* hindeutet (67, 259). Dies ist nicht unwahrscheinlich, da *L. pneumophila* während einer Infektion von *Dictyostelium discoideum* nicht nur in den Prozess der intrazellulären Vesikelfusion interferiert, sondern auch den Wirtsmetabolismus beeinflusst. Dies beinhaltet abgesehen von einer Induktion von *D. discoideum* Stress-Proteingenen wie der Superoxid-Dismutase (*sodB*), einer alternativen Oxidase (*aoxA*) und von Amino-Acyl tRNA-Synthetasen, auch eine Beeinflussung des Phosphoinositid-Metabolismus, und von Enzymen, die in den Nukleotid-Metabolismus involviert sind, um möglicherweise energetisch hochwertige Produkte zur Unterstützung des bakteriellen Metabolismus aufzunehmen (259, 295). Um jedoch das komplexe Zusammenspiel zwischen Metabolismus und Virulenz bei *L. pneumophila* besser zu verstehen, könnte eine systematische Mutations-basierte Analyse metabolischer Stoffwechselwege gekoppelt mit einer biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung metabolischer Kapazitäten hilfreich sein.

## 4.2 PatA – ein Patatin-ähnliches Protein von *L. pneumophila*

### 4.2.1 Charakterisierung der hämolytischen und lipolytischen Eigenschaften von PatA

Nach rekombinanter Expression des PatA-Proteins in *E. coli* BL21 war dieser im Gegensatz zum *E. coli* BL21 Wildtyp in der Lage, humane Erythrozyten zu lysieren. Dagegen zeigte die rekombinante Expression der Proteinvariante PatAS73A, in der eine der Aminosäuren der in der N-terminalen Hälfte des Proteins liegenden katalytischen Diade mutiert wurde, eine um die Hälfte reduzierte Aktivität gegenüber dem Volllängenprotein. Eine C-terminale Verkürzung des Proteins, PatAK492Stop, hatte keinen Einfluss auf das hämolytische Potential, denn die hämolytische Aktivität war nur etwas geringer, was auch auf im SDS-Gel nicht erkennbare Expressionsunterschiede zurück geführt werden kann, und war damit vergleichbar mit der des Volllängenproteins. Außerdem waren bei den durchgeführten Experimenten, die Standardabweichungen bei der Testung des *E. coli* Klones, der PatA exprimiert, relativ hoch, weshalb minimale Aktivitätsunterschiede nicht eindeutig verifizierbar sind. Die Durchführung von drei voneinander unabhängigen Experimenten zeigte jedoch in allen Fällen die gleiche Tendenz der Ergebnisse. Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das katalytische Zentrum in der N-terminalen Proteinhälfte hauptsächlich für die hämolytische Eigenschaft des Proteins verantwortlich ist, während der C-Terminus eine andere Funktion erfüllt. Da bei Expression von PatAS73A jedoch keine vollständige Reduktion des hämolytischen Potentials zu verzeichnen war, könnte es sein, dass zusätzlich noch andere Proteinregionen zur Aktivität beitragen. Diese könnten möglicherweise auch im C-Terminus lokalisiert sein, was den geringen Aktivitätsverlust der Proteinvariante PatAK492Stop erklären würde. Auch VanRheenen und Mitarbeiter bemerkten bereits, dass die Phospholipase-Domäne von PatA zur Zytotoxizität des Proteins beiträgt, aber auch die C-terminale Hälfte des Proteins in dieser Hinsicht eine Rolle spielen könnte (177). Um auf eine unterschiedliche Expression zurückzuführende Abweichungen zu minimieren, wurde der Hämolyse-Assay ebenfalls mit gereinigten Proteinvarianten durchgeführt. Es war jedoch in keinem Fall eine hämolytische Aktivität der gereinigten Proteine zu verzeichnen, wofür möglicherweise das Fehlen zusätzlicher bakterieller Faktoren, ein partieller Aktivitätsverlust oder ein gestörtes Zusammenwirken von Faktoren in diesem *in vitro* Experiment verantwortlich sein könnte. Trotz Zugabe von *E. coli* BL21 Zelllysat konnte keine hämolytische Aktivität der gereinigten Proteine detektiert werden, so dass letztgenannte Gründe mit höherer Wahrscheinlichkeit zutreffen könnten.

Versuche zum lipolytischen Verhalten ergaben, dass PatA sowohl Phospholipase A- (PLA) als auch Lysophospholipase A (LPLA) -Aktivität besitzt. Vor allem das Substrat Phosphatidylglyzerol (DPPG) wurde gespalten, was auf eine hauptsächliche PLA-Aktivität hindeutet, aber auch Phosphatidylcholin (DPPC) und die Lysophospholipide Lysophosphatidylglyzerol (MPLPG) und Lysophosphatidylcholin (MPLPC) sowie Cardiolipin wurden umgesetzt. Cardiolipin (1,3-*bis(sn-3'-Phosphatidyl)-sn-Glyzerol*) ist ein nur in bakteriellen Membranen und der inneren Mitochondrienmembran von Säuger- und Pflanzenzellen vorkommendes anionisches Phospholipid, für dessen Katabolismus wahrscheinlich eine katalytische Reaktion der Phospholipase A<sub>2</sub> notwendig ist (296). Da PatA Homologie zur humanen zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> aufweist und Cardiolipin ein *in vitro* -Substrat von PatA darstellt, könnte PatA auch *in vivo* am bakteriellen Cardiolipin-Metabolismus beteiligt sein. Cardiolipin gilt als essentiell für eine optimale Funktion vieler in den mitochondrialen Energiemetabolismus involvierter Enzyme wie z. B. der Cytochrom-c-Oxidase, ist an der Translokation von Cholesterol von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran beteiligt und wurde als bedeutsam für die Cholesterol-Biosynthese in HeLa-Zellen beschrieben (296, 297). In *E. coli* bildet Cardiolipin-Membrandomänen an Zellpolen und Zellteilungsstrukturen, wo es direkt mit Zellzyklus- und Zellteilungsproteinen wie DnaA (Initiation der DNA-Replikation am *oriC*), und FtsA (bakterielles Aktin, *linker*-Protein für Zytoskelett-Protein FtsZ (bakterielles Tubulin)) interagiert (298). Dabei kann Cardiolipin durch Phosphatidylglyzerol substituiert werden, der Verlust beider anionischen Phospholipide resultiert jedoch in einer schweren mitochondrialen Dysfunktion in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (299). Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass PatA beide Substratspezifitäten besitzt. PatA könnte möglicherweise in *Legionella* auch an Cardiolipin-Membrandomänen in Zellpolen und Zellteilungsstrukturen binden und in die damit verbundenen Prozesse involviert sein.

Lipaseaktivität, nachgewiesen durch eine Spaltung von 1-MPG, konnte dagegen nicht detektiert werden. PatA scheint demnach eine PLA mit geringerer LPLA-Aktivität zu sein. Die katalytisch inaktive Proteinvariante PatAS73A, die ein mutiertes Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G, welches zu G-X-A-X-G modifiziert wurde, beinhaltete, besaß gegenüber allen fünf getesteten Substraten eine stark reduzierte Phospholipase- bzw. Lysophospholipaseaktivität. Die lipolytische Aktivität von PatAK492Stop war, abgesehen von einer etwas geringeren Aktivität gegenüber DPPG, annähernd mit der Aktivität von PatA vergleichbar. Der C-Terminus scheint, wie für die hämolytische Aktivität bereits festgestellt,

nahezu keinen Einfluss auf das lipolytische Potential von PatA zu haben. Damit lag die Schlussfolgerung nahe, dass die Phospholipaseaktivität von PatA eindeutig zur in der N-terminalen Proteinhälfte gelegenen Patatindomäne des Proteins zugeordnet werden muss. Weiterhin könnte die Fähigkeit zur Hydrolyse von DPPC auch die hämolytische Eigenschaft von PatA erklären, da DPPC ein in eukaryontischen Membranen hauptsächlich vorkommendes Phospholipid ist. Im Gegensatz zur hämolytischen Aktivität, die bei keiner der gereinigten Proteinvarianten sondern nur nach rekombinanter Expression in *E. coli* BL21 detektiert werden konnte, zeigte das gereinigte PatA-Protein lipolytische Aktivität, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass ein Zusammenwirken mit zusätzlichen bakteriellen oder eukaryotischen Faktoren oder eine mögliche Aktivierung des Proteins durch ebensolche nicht vordergründig zu sein scheint. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Lipidsubstrate durch den Einsatz von Detergenzien im Lipidhydrolyse-Assay als Mizellen vorliegen und diese damit vermutlich besser angreifbar sind, als eine intakte Erythrozytenmembran. Der fehlende Nachweis einer hämolytischen Aktivität der gereinigten PatA-Proteinvarianten könnte also auch darin begründet liegen oder weitere komplexe Ursachen haben. Für das nach rekombinanter Expression gereinigte ExoU-Protein aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte jedoch im Gegensatz zu PatA keine lipolytische Aktivität detektiert werden. Dies war erst nach Exposition des Proteins zu eukaryotischem Zellextrakt der Fall (179). Der Kofaktor, den ExoU benötigte, stellte sich später als die eukaryotische Superoxiddismutase heraus (191). Auch das rekombinante Patatin-ähnliche PLA<sub>2</sub>-homologe Protein RT0522 aus *Rickettsia typhi* ist für die Aktivierung der Phospholipase A-Aktivität dieses Proteins auf einen eukaryotischen Wirtskofaktor angewiesen (174). Ob PatA auch mit eukaryotischen oder bakteriellen Proteinen zusammenwirkt ist bisher unbekannt, wäre aber vor allem im Hinblick auf die Aktivierung der hämolytischen Aktivität denkbar. PatA und das stark zytotoxisch wirkende ExoU-Protein scheinen sich also trotz vorhandener Homologien möglicherweise in ihrer Funktion zu unterscheiden.

#### **4.2.2 Identifikation wichtiger Proteindomänen für die intrazelluläre Lokalisation von PatA**

Eine Gemeinsamkeit zwischen ExoU und PatA ist jedoch deren zelluläre Lokalisation nach ektopischer Expression in eukaryotischen Zellen. Die ektopische Expression prokaryotischer Proteine in eukaryotischen Zellen ist eine weit verbreitete Methode um deren Funktionen zu untersuchen und ihre Wirtszellstrukturen zu identifizieren. Dabei kann durch diese Methode

eine Beteiligung anderer bakterieller Faktoren (z. B. Effektoren des Typ IV-Sekretionssystems) am Lokalisationsprozess eines ektopisch exprimierten Proteins ausgeschlossen werden. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass ein GFP-PatA-Fusionsprotein nach ektopischer Expression in A549 Lungenepithelzellen in punktförmigen Strukturen verteilt an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle lokalisiert, wofür der C-Terminus essentiell zu sein schien (196). Diese Beobachtung konnte bestätigt werden, wobei die hier beschriebene Lokalisation von PatA der für *P. aeruginosa* ExoU publizierten Lokalisation an der Zytoplasmamembran entspricht, für die ebenfalls eine Abhängigkeit von der C-terminalen Region des Proteins gezeigt wurde (195).

Eine Lipidierung von Proteinen, die posttranslationale Modifikationen durch Myristoylierung, Palmitoylierung/Azylierung oder Prenylierung einschließt, erhöht die Hydrophobizität von Proteinen, um diese zu Membranzielstrukturen zu leiten und dort deren Verankerung in der Lipiddoppelschicht oder ihre Assoziation mit anderen hydrophoben Proteinen zu begünstigen (300, 301). Eukaryotische Proteine wie z. B. Ras und Rab, Proteinkinasen und Tyrosin-Phosphatasen werden häufig über deren C-terminales CaaX-Motiv (a steht für eine hydrophobe Aminosäure, X für eine beliebige Aminosäure), das durch eine kovalente Bindung eines Terpen-Rests (z. B. Farnesol, Geranylgeraniol, Dolichol) an ein konserviertes Cystein prenyliert wird, in Membranen verankert (302). Dagegen ist der Mechanismus, durch den eine Vielzahl injizierter bakterieller Effektoren an Wirtsmembranen verankert wird, unbekannt. Um biologisch aktiv zu werden, besitzen viele translozierte mikrobielle Effektoren eukaryotische posttranslationale Motive, deren Modifikation durch Enzyme des Wirtes katalysiert wird (303, 304). Dazu nutzen Pathogene oftmals die wirtseigene Prenylierungsmaschinerie aus, um ihre Effektoren gezielt in Wirtsmembranen zu verankern. Dieser Prozess wird dadurch unterstützt, dass viele mikrobielle Proteine auch CaaX-Motive besitzen, wobei das Vorhandensein der hydrophoben Aminosäuren, nicht jedoch das konservierte Cystein, für eine Prenylierung entbehrlich zu sein scheinen (305, 306). SifA von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium und AnkB von *L. pneumophila* waren die Effektoren, für die zuerst eine wirtsbeeinflusste Prenylierung und darauf folgende Verankerung an der LCV-Membran beschrieben wurde (303, 307). Für PatA wurde bisher kein solches CaaX-Motiv beschrieben, das Protein besitzt jedoch ein Cystein in der C-terminalen Hälfte an Position 499 und mehrere Lysinreste, die als potentielle Azylierungsstellen fungieren könnten. Dabei weist nur Lysin K510 das für die Azylierung bakterieller Proteine charakteristische Motiv „GK“ auf (231). Ebenso wird auch die zu PatA

homologe humane zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> an der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes azyliert, was eine Konvertierung des löslichen Proteins in eine Membran-penetrierende Form bewirkt und verstärkend auf die Interaktion mit Lipiddoppelschichten wirkt (308). Eine Mutation der potentiellen Azylierungsstellen bewirkte jedoch keine Änderung der Lokalisation der mutierten GFP-PatA-Proteinvarianten an der Zytoplasmamembran der A549 Lungenepithelzellen. Da die Proteinmodifikation durch das Anhängen einer einzigen Fettsäurekette vor allem in hydrophilen Proteinen für eine Membranbindung oftmals nicht ausreichend ist, wird häufig eine zweite Fettsäure inkorporiert um die Membranaffinität des Proteins zu verstärken (309). Deshalb wurden sowohl C499 als auch K510 in GFP-PatA gemeinsam ausgetauscht, um beide potentiellen Azylierungsstellen zu mutieren. Doch auch diese Proteinvariante lokalisierte an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, weshalb eine einfache oder mehrfache Azylierung von PatA eher unwahrscheinlich erscheint. Im Falle von *Salmonella* SifA wurde trotz einer Mutation im CaaX-Motiv eine teilweise weiter bestehende Membranassoziation des Proteins beobachtet, die vermuten ließ, dass zusätzliche Faktoren in diesen Prozess involviert sind (310, 311). Tatsächlich wurde herausgefunden, dass SifA zusätzlich noch durch S-Palmitoylierung oder -Azylierung an einem dem prenylierten Cystein benachbarten Cysteinrest modifiziert wird und jede dieser beiden Modifikationen für eine Membranlokalisation ausreichend sein könnte (304). Außerdem wurden zwei weitere *Salmonella*-Effektoren beschrieben, bei denen ein konserviertes N-terminales Cystein durch S-Palmitoylierung modifiziert wird, was eine Lokalisation dieser Proteine an der Wirtsplasmamembran bedingt (312). Die Mechanismen einer Proteinmodifikation, die einen Einfluss auf dessen subzelluläre Lokalisation haben, können deshalb sehr vielfältig sein, sich gegenseitig ergänzen oder in verschiedenen Bereichen des Proteins auftreten, weshalb sich eine Determinierung der für die Lokalisation essentiellen Bereiche sehr schwierig gestalten kann.

Zur Eingrenzung des für die Lokalisation wichtigen C-terminalen Bereiches wurde das GFP-PatA-Protein deshalb sequentiell C-terminal verkürzt. Unter Berücksichtigung der Vorhersagen zu potentiellen Sekundärstrukturen, die die mögliche Präsenz einer putativen Transmembranregion zwischen den Aminosäuren Lysin 533 und Asparaginsäure 555 ergab, wurde das Protein einige Aminosäuren vor dieser Region nach Lysin 510 und nach diesem Bereich an Position Lysin 566 verkürzt. Ebenso wurde eine GFP-PatA-Variante entworfen, bei der nur die letzten 10 Aminosäuren des C-Terminus fehlten (GFP-PatAR611Stop). Innerhalb dieser letzten 10 Aminosäuren des C-Terminus von PatA befindet sich ein in den



Stämmen *L. pneumophila* Philadelphia, Corby, Paris und Alcoy konserviertes Serin an Position 615, an das sich auf den nachfolgenden zwei Aminosäuren zwei Threoninreste im Stamm Philadelphia anschließen, was auf ein mögliches konserviertes Motiv hindeutete. Ein Austausch des Serin 615 zu Alanin und der drei Aminosäuren S615/ T616/ T617 gleichzeitig bewirkte jedoch auch keine Änderung der peripheren Zytoplasmamembranlokalisation von PatA, weshalb davon ausgegangen werden könnte, dass das konservierte Serin für die Lokalisation keine Rolle zu spielen scheint. Eine systematische Verkürzung des C-Terminus von PatA erschien deshalb Erfolg versprechender im Hinblick auf die Identifikation wichtiger Proteindomänen für die subzelluläre Lokalisation. Dabei zeigte das kürzeste Protein GFP-PatAK510Stop eine dem Leervektor (pEGFP-C2) vergleichbare diffuse zytoplasmatische Lokalisation, wohingegen die beiden anderen Proteine GFP-PatAK566Stop und GFP-PatAR611Stop überwiegend an der Zytoplasmamembran lokalisierten. Somit lag die Schlussfolgerung nahe, dass sich der für die Lokalisation von PatA essentielle Bereich im C-Terminus zwischen den Aminosäuren Lysin 510 und Lysin 566 befindet.

Eine vollständige Deletion der putativen Transmembranregion zwischen den Aminosäuren K533 und D555 bewirkte eine diffuse, zytoplasmatische Lokalisation dieser GFP-PatA-Proteinvariante. Diese putative Transmembrandomäne scheint deshalb für die Lokalisation von PatA an der Zytoplasmamembran von großer Bedeutung zu sein und lässt deshalb vermuten, dass es sich bei PatA um ein Protein handelt, das in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle verankert wird. Transmembrandomänen von Proteinen, die meist aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren bestehen, bilden konformationell i. d. R.  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen um Interaktionen des polaren Rückgrates der Polypeptidkette mit den umgebenden Lipiden zu minimieren (313). Transmembrandomänen spielen z. B. bei Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin eine wichtige Rolle (314). Aber auch *L. pneumophila* Dot/Icm-Substrate wie z. B. das LegC3-Protein (*Legionella* eukaryotic-like gene), das nach Expression in Hefezellen sowohl mit der Plasmamembran als auch assoziiert mit punktförmigen, vakuolären Strukturen auftritt, besitzt zwei putative Transmembrandomänen, deren Deletion zu einer veränderten Lokalisation des Proteins hin zu zytoplasmatischer Lokalisation führte (315).

Eine zweite Deletion, durchgeführt im Bereich der Aminosäuren Glutamat 519 bis Glutamat 527, die als so genannte „low complexity region“ (LCR) identifiziert werden konnte, führte ebenfalls zu einer diffusen, zytoplasmatischen Lokalisation. Diese Region, die im Falle von

PatA durch das gehäufte Auftreten von Glutamat- und Alaninresten gekennzeichnet ist, könnte als eine flexible *Linker- oder Spacer*-Sequenz zwischen kompakten Domänen fungieren und damit eine mögliche Bindung an andere Proteine oder Membranbereiche unterstützen. Obwohl LCRs häufig in Proteinen auftreten, sind sie noch weitgehend unerforscht. Eine Studie von Sim und Creamer, der ein Datensatz von 26 Prokaryotengenomen zugrunde lag, gibt an, dass in einem von neun Proteinen eine LCR auftritt (233). Weiterhin wurde in dieser Studie ermittelt, dass rund 11 % der untersuchten Proteinfamilien konservierte LCRs besitzen, was die Hypothese nahe legt, dass eine Konservierung dieser Abschnitte aus funktionellen Gründen (Substratbindung, Protein-Protein-Interaktionen, strukturelle Integrität) heraus erfolgt. Der höchste Grad an Konservierung fand mit 94,8 % bei den NAD-abhängigen Aldehyd-Dehydrogenasen, wie z. B. PutA von *Caulobacter crescentus*, das 6 LCRs enthält, statt (233). Weitere Beispiele für Funktionsbeziehungen von LCRs stellen DNA- und RNA-Helikasen wie der Initiationsfaktor 4a von *S. cerevisiae* dar, der eine Glycin- und Arginin-reiche LCR besitzt, die als flexible *Linker*-Sequenz als Teil eines konservierten Motivs in die Nukleinsäurebindung involviert ist (233). Auch die ubiquitär vorkommenden DnaJ Chaperon-Proteine besitzen eine hochkonservierte, lange Glycin-reiche LCR-Domäne, die wichtig für die Aktivierung der Substratbindungsstelle des Partner-Chaperons DnaK ist (233). Interessant ist auch eine Studie von Coletta und Mitarbeitern, die propagiert, dass LCR-enthaltende Proteine mehr Bindungspartner in Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken zu haben scheinen, als Proteine, die keine LCRs besitzen (316). Im Falle von PatA unterstützt die LCR-Region möglicherweise eine putative Assoziation der nachfolgenden Transmembranregion mit der Wirtszytoplasmamembran. Dies würde erklären, dass sowohl eine Deletion der LCR als auch der putativen Transmembranregion eine Lokalisation an der Zytoplasmamembran verhindert und legt die Vermutung nahe, dass ein komplexes Zusammenwirken beider Bereiche für eine effiziente Membranbindung stattfinden könnte.

Zur Abschätzung der Häufigkeit, mit der GFP-PatA und die katalytisch inaktiven, mutierten GFP-PatA-Proteine in transfizierten A549 Wirtszellen eine zytoplasmatische Lokalisation zeigen, wurde eine Quantifizierung vorgenommen. Die Häufigkeit mit der GFP-PatA und eine katalytische inaktive Proteinvariante GFP-PatAS73A an der Zytoplasmamembran zu finden waren, betrug zwischen 56 und 60 % und war bei vergleichbarer Transfektionseffizienz damit sehr ähnlich. Eine ähnliche Häufigkeit der Zytoplasmamembranlokalisation zwischen 50 und 62 % konnte ebenso für die katalytisch inaktiven, verkürzten Proteinvarianten GFP-

PatAK566StopS73A und GFP-PatAR611StopS73A beobachtet werden, was die Ergebnisse der vorherigen Experimente bestätigt und suggeriert, dass der C-terminale Bereich nach der Aminosäureposition 566 keine Rolle für die Lokalisation des Proteins zu spielen scheint. Da die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt (22-stündige Expression) fixiert wurden, ist zu anderen Zeitpunkten eine Abweichung von diesen Prozentsätzen möglich. Weiterhin stellt der Zeitpunkt der Fixierung eine Momentaufnahme dar, d. h. in einigen Zellen könnte sich das GFP-PatA-Protein noch auf dem Weg zur Membran befinden oder sich eventuell auch schon wieder von der Membran entfernt haben bzw. von Zelle zu Zelle unterschiedlich stark, zu verschiedenen Zeitpunkten oder nicht kontinuierlich exprimiert werden, was erklären könnte, warum der Prozentsatz der Zellen, die eine Membranlokalisation von GFP-PatA zeigen, nicht höher ist. Charakteristisch ist jedoch die Lokalisation von GFP-PatA (-Varianten) an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle in punktförmigen Strukturen. Ein derartiges Erscheinungsbild wurde auch für *P. aeruginosa* ExoU nach ektopischer Expression beschrieben (195, 317). Dabei wird ExoU nach Lokalisation an der Plasmamembran durch Anheftung zweier Ubiquitin-Moleküle an Lysin 178 modifiziert (317). Eine Region von fünf Aminosäuren an den Positionen 679 bis 683 nahe des C-Terminus von ExoU kontrolliert sowohl die Membranlokalisation als auch die Ubiquitinierung des Proteins und spielt außerdem eine Rolle für die Zytotoxizität und *in vitro* Phospholipase-Aktivität (317). Diese Aminosäurefolge konnte im PatA-Protein, das nur aus 621 Aminosäuren besteht, jedoch nicht verzeichnet werden. Ebenso wurde erst kürzlich für VipA, ein zusammen mit VipD/PatA identifizierter T4BSS-Effektor, der ebenso Vesikeltransportstörungen nach Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hervorrief (166), eine punktförmige Lokalisation von VipA-GFP nach ektopischer Expression in eukaryotischen Zellen und der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben (318). In der Hefe und auch in den CHO-Zellen waren diese punktförmigen Strukturen assoziiert mit Aktin-reichen Regionen und Komponenten des *Multivesicular Body Pathway* (318). Im Gegensatz zu VipD/PatA konnten für VipA zwar keine putativen Transmembrandomänen vorhergesagt werden, in einem Bereich nahe des C-Terminus des nur aus 352 Aminosäuren bestehenden Proteins befindet sich jedoch zwischen den Aminosäuren an Position 266 bis 275 eine durch das gehäufte Auftreten von Prolinresten determinierte „*low complexity region*“. Ob diese Region eine Rolle für die Lokalisation von VipA spielt, ist bisher unbekannt und könnte durch Mutagenesestudien untersucht werden.

Auffallend war, dass Wirtszellen, die nur die C-terminale Proteinhälfte (Aminosäuren E493 bis H621) von PatA gekoppelt an GFP exprimierten, eine intrazelluläre Proteinlokalisation

zeigten und sich in einem schlechten physiologischen Zustand befanden, was eventuell auf toxische Effekte zurückzuführen sein könnte. Im Gegensatz zum ExoU-Protein, ein potentes Zytotoxin, dessen Expression in Wirtszellen unmöglich ist, weshalb auf eine katalytisch-inaktive Mutante zurückgegriffen werden muss (179), wird das katalytisch aktive PatA-Protein von den Wirtszellen relativ gut toleriert. Seine höchstens milde Toxizität, die nach Überexpression in der Hefe *S. cerevisiae* bereits beschrieben wurde (177), beschränkt sich daher wahrscheinlich nur auf den C-terminalen Bereich. Wird nur dieser Bereich allein exprimiert, scheint dies für die Wirtszellen ungünstige Auswirkungen auf deren physiologischen Zustand zu haben. Da dieses Fusionsprotein wesentlich kürzer als das Vollängenprotein ist, könnte es eventuell stärker und in kürzerer Zeit exprimiert werden, was die toxischen Effekte potenzieren könnte. Ebenso vorstellbar wäre eine protektive Funktion des N-Terminus von PatA, so dass sich die zytotoxische Wirkung der C-terminalen Domäne erst nach Wegfall des N-terminalen Proteinbereiches entfalten könnte. Wie in den vorangegangenen qualitativen Experimenten konnte für die katalytisch inaktiven, teilweise deletierten Proteinvarianten GFP-PatADel519-527S73A (Deletion der „*low complexity region*“) und GFP-PatADel533-555S73A (Deletion der putativen Transmembrandomäne) der fast vollständige Verlust der Fähigkeit an der Zytoplasmamembran zu lokalisieren mit Prozentsätzen von 93 % bzw. 100 % für eine zytoplasmatische Lokalisation belegt werden. Dies bestätigt noch einmal die bereits diskutierte Bedeutung dieser Proteinbereiche für die intrazelluläre Lokalisation von PatA. In *P. aeruginosa* ExoU wurden dagegen sechs individuelle, über den C-terminalen Bereich verteilte Aminosäuren für dessen Aktivität determiniert, deren Substitution in einem Verlust der Membrananheftung, verringerter Zytotoxizität und reduzierter phospholipolytischer Aktivität resultiert (319). Da die C-Termini von PatA und ExoU zueinander jedoch keine Homologien besitzen, konnten in dieser Hinsicht ähnliche Aminosäurereste im PatA-Protein nicht aufgefunden werden. Für ExoU konnten keine Transmembrandomänen, jedoch vier LCRs zwischen den Aminosäuren 111-122, 169-183, 407-421 und 479-493 vorhergesagt werden<sup>1</sup>. Gendrin und Mitarbeiter publizierten kürzlich neuere Erkenntnisse zur strukturellen Basis der durch ExoU vermittelten Zytotoxizität (320). Demnach scheinen sich ExoU und sein Chaperon SpcU, das für die Typ III-Sekretion benötigt wird, in eine Membranbindungs-, Brücken-bildende-Domänen und eine Phospholipase-Domäne zu falten. Interessant ist, dass die 2. Brücken-bildende Domäne zwischen den AS 480-580, die damit auch die putative LCR-Region (AS479-493) beinhaltet und zwischen Phospholipase- und Membranbindungsdomäne liegt, möglicherweise eine

---

<sup>1</sup>[www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de)

Plattform bildet, um die katalytische Domäne und die Membranbindungsdomäne von ExoU einander anzunähern (320). Gendrin und Mitarbeiter gehen davon aus, dass diese Chaperon-gebundene Konformation von ExoU eine inaktive Form darstellt, die nach Bindung an der Zytoplasmamembran eine Konformationsänderung erfährt und seine Phospholipase-Aktivität entfalten kann (320). Im Falle von PatA liegt die vorhergesagte LCR ebenfalls zwischen der katalytischen Phospholipasedomäne und der putativen Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich, weshalb die LCR möglicherweise als flexible *Linker*-Domäne fungieren könnte, um eine effizientere Membranbindung zu erlauben und somit eventuell die katalytische Funktion der Phospholipase-Domäne zu unterstützen. Abschließend kann jedoch nicht genau geklärt werden, ob im PatA-Protein die gesamten Proteinbereiche, die deletiert wurden, oder einzelne Aminosäuren innerhalb dieser Bereiche die Lokalisation an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle determinieren. Zur Klärung dieser Frage könnten gezielte Mutagenesestudien hilfreich sein. Weiterhin besteht noch Forschungsbedarf im Hinblick auf die Fragen, wie genau die für die Lokalisation bedeutsamen C-terminalen Bereiche die Plasmamembranbindung bedingen, welche Funktion dem Protein dort zukommt, ob und wenn ja, welche eukaryonten Faktoren dafür entscheidend sind.

Eine Western Blot Expressionskontrolle offenbarte, dass alle Proteinvarianten in den Zellen zwar exprimiert wurden, die Signalstärken der Banden jedoch sehr unterschiedlich ausfielen. Ein möglicher Grund dafür könnte, abgesehen von einer unterschiedlich starken Expression der einzelnen Proteine, das Auftreten einer starken unspezifischen Bande, die auch in der Kontrolle, d. h. den nicht transfizierten A549 Zellen auftrat, sein. Damit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der monoklonale *anti*-GFP Antikörper auch noch an ein eukaryotisches Protein bindet und deshalb sehr viele Antikörpermoleküle für die spezifische Bindung der GFP-PatA-Proteine verloren gehen. Durch den Einsatz eines PatA-Antikörpers konnten jedoch nur GFP-PatA, GFP-PatAS73A, GFP-PatAK566StopS73A und GFP-PatAR611StopS73A detektiert werden. Auf Grund dessen liegt die Vermutung nahe, dass der PatA-spezifische Antikörper den C-terminalen Proteinbereich zwischen den Aminosäuren K492 und K566 für eine Bindung benötigen könnte.

Die Lokalisation von GFP-PatA in punktförmigen Strukturen an der Wirtszytoplasmamembran nach Expression in A549 Lungenepithelzellen, ähnelte einer bereits beobachteten Lokalisation des *Bordetella pertussis* Adenylat-Zyklase Toxins (CyaA) an der Plasmamembran eukaryotischer Zellen nach Zugabe des Proteins. In diesem Fall wurde

beschrieben, dass ein Integrin-CyaA-Komplex an *Lipid Rafts* der Zellmembran rekrutiert wird, wo die Cholesterol-reiche Lipidumgebung eine Translokation der Adenylat-Zyklase (AC)-Domäne durch die Membran fördert. Eine Depletion von Cholesterol und die damit verbundene Zerstörung von *Lipid Rafts* in den Wirtszellen ging mit einer Inhibition der Adenylat-Zyklase Translokation einher (202). Abgesehen von ihrer wichtigen Rolle bei der Signaltransduktion, der Rezeptor-Internalisierung, dem Vesikel-*sorting* und dem Transport von Cholesterol (239), werden *Lipid Raft*-Komponenten oft als spezifische Rezeptoren für den Zelleintritt von Toxinen, pathogenen Bakterien oder Viren ausgenutzt (240-242). Da noch ungeklärt ist, welche Rolle PatA an der Zytoplasmamembran spielt, wäre eine Spezifizierung der Lokalisation im Bereich der *Lipid Rafts* ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Funktion des Proteins. Vorstellbar wäre auch eine Translokation von PatA durch die Wirtszellmembran, wo der in einer frühen Phase der Infektion über das Dot/Icm-System-sekretierte Effektor (166) durch seine Phospholipaseaktivität die bakterielle Kolonisation des Lungenepithels unterstützen könnte. Es wurde erwartet, dass sich durch eine Depletion von Cholesterol in den Wirtszellen keine *Lipid Rafts* mehr ausbilden könnten, und so die charakteristische Lokalisation von PatA in punktförmigen Strukturen an der Zytoplasmamembran nicht mehr stattfinden würde. Allerdings konnte durch den Einsatz eines speziellen delipidierten FCS mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie in den A549 Lungenepithelzellen keine Reduktion des Cholesterolanteils erreicht werden. Es fiel jedoch auf, dass bei in delipidiertem Serum kultivierten A549 Zellen der Spot für die freien Fettsäuren wesentlich größer war und im Gegensatz dazu der Spot für Cholesterolester bedeutend schwächer im Vergleich zu den Spots für die „normal“ kultivierten Zellen. Die Fettsäuren scheinen sich also entweder während der Kultivierung anzuhäufen, da sie offenbar nicht mehr zu Cholesterolester verestert werden können oder die Unterschiede sind eventuell durch Variation der Anteile an Fettsäuren, Cholesterol und Cholesterolester im jeweilig eingesetzten Serum zu begründen. Eine Serumkontrolle, die in der Dünnschichtchromatografie mitgeführt wird, würde mögliche Unterschiede sichtbar machen. Vielmehr bewirkte die Art der Kultivierung in delipidiertem FCS den Verlust der Fähigkeit zu adhären und möglicherweise auch die Kompetenz zu Aufnahme von DNA, denn eine Expression des transfizierten PatA-Proteins konnte nicht nachgewiesen werden. Da das Transfektionsreagenz laut Herstellerangaben auch für Suspensionszellkulturen geeignet ist, erscheint die fehlende Adhärenz der A549 Lungenepithelzellen für den Transfektionsprozess eher von untergeordneter Bedeutung zu sein. Weiterhin könnte auch die Membranintegrität der alternativ kultivierten Zellen gestört sein, was Auswirkungen auf deren physiologischen

Zustand haben könnte. In U937 Makrophagen konnte zwar eine Reduktion des Cholesterolgehaltes, nicht aber eine Expression von PatA in diesem Zelltyp nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine veränderte Membranfluidität sein, die eine Transfektion unmöglich machen oder deren Effizienz verringern könnte. Erschwerend kam hinzu, dass der für die Lokalisation von PatA nach ektopischer Expression in A549 Lungenepithelzellen beschriebene Phänotyp in den U937 Makrophagen nicht bestätigt werden konnte, was vermuten lässt, dass dieser Phänotyp zelltypspezifisch sein könnte und das PatA-Protein in unterschiedlichen Zelltypen auch unterschiedliche Funktionen ausüben könnte. Es war deshalb von großer Bedeutung, dass PatA-Protein in *Legionella* zu exprimieren und in einer Wirtszellinfektion zu lokalisieren.

#### 4.2.3 Lokalisation von PatA während einer Wirtszellinfektion

Um die subzelluläre Lokalisation von PatA in Wirtszellen unter physiologischen Bedingungen zu beurteilen, wurden U937 Makrophagen mit *L. pneumophila*-Kulturen infiziert, die ein 3×-Flag-PatA-Fusionsprotein sowohl überexprimierten als auch unter Kontrolle des nativen Promotors exprimierten. Ein mikroskopischer Nachweis des PatA-Proteins, das mit *L. pneumophila* assoziiert vorliegt, konnte durch Einbringen der Plasmide in *L. pneumophila* JR32 und eine *L. pneumophila* JR32 *AdotB*-Sekretionsmutante nicht erbracht werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Expression zu gering war und unterhalb der Nachweisgrenze lag. Im Western Blot mit den Plasmid-exprimierenden *Legionella*-Kulturen, der weitaus sensitiver ist und mit dem auch geringe Proteinmengen nachgewiesen werden können, konnte in allen Fällen ein für Flag-PatA-spezifisches Signal detektiert werden, so dass von einer Expression ausgegangen werden kann. Sowohl bei einer Überexpression von PatA als auch einer Expression unter dem nativen Promotor, konnten in Einzelfällen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (20 min nach Infektion, 1 h, 8 h) Flag-PatA-spezifische Signale an der Membran der Wirtszelle detektiert werden, die die charakteristischen punktförmigen Strukturen ausbildeten, welche schon nach einer ektopischen Expression in A549 Lungenepithelzellen beobachtet werden konnten. Dies war jedoch nur in Einzelfällen sichtbar, so dass möglicherweise ein generelles Problem in Bezug auf die Nachweisgrenze konventioneller Immunfluoreszenztechniken zum Tragen kommt. Diese Nachweisgrenze wurde mit einigen tausend Molekülen pro Zelle angegeben (321) und spezifiziert auf gängige Methoden basierend auf der Anwendung Fluorescein-konjugierter Antikörper, sollten ca. 2000 Moleküle des Zielantigens pro Zelle vorhanden sein, damit ein

Nachweis erfolgen kann (322). Möglicherweise war die Expression von Flag-PatA zu gering und konnte deshalb zwar im Western Blot, jedoch nur in wenigen Fällen immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Auch in Vorarbeiten war ein Proteinnachweis durch den Einsatz verschiedener PatA-spezifischer Antikörper nicht erfolgreich (196). Eine Abhängigkeit der Expression vom jeweiligen physiologischen Zustand und der generellen Wachstumsphase der eingesetzten Bakterienkulturen, sowie einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion wäre denkbar. Diese optimalen Bedingungen sind eventuell nur in Einzelfällen getroffen worden. Da die Sensitivität *Flow*-zytometrischer Methoden mit der Detektion von rund 100 Zielmolekülen pro Zelle wesentlich höher ist (322), könnte eine Option sein, zunächst durch *Cell Sorting* eine Vorauswahl an „expressionsstarken“ Zellen zu treffen und diese dann eingehender hinsichtlich der Lokalisation des PatA-Proteins zu untersuchen. Sehr erschwerend auf die Versuchsdurchführung wirkte sich das Auftreten vieler Proben mit zerstörten Zellen, die massive Zellschädigungen, aufgebläht und löchrig erscheinende Zellkerne sowie einen offensichtlichen Verlust der Zytoplasmamembranbarriere aufwiesen. Diese Proben mit zerstörten Zellen traten nicht kontinuierlich nur bei einem *Legionella*-Stamm bzw. Plasmidkonstrukt auf, was eine Ursachenanalyse weiterhin erschwerte. Da sich die Versuche über einen Zeitraum von ca. sechs Monaten erstreckten und nach Erreichen der Passagiergrenze periodisch neue Zellen aus dem Stickstoff aufgetaut wurden, ist ein generell schlechter physiologischer Zustand der Zellen eher unwahrscheinlich. Auch Kontrollen zu eventuell vorkommenden Zellkulturkontaminanten (z. B. Mykoplasmen) blieben negativ. Mögliche toxische Effekte sollten durch den Einsatz einer katalytisch-inaktiven Variante des Flag-PatA-Proteins, für die allerdings kein Expressionsnachweis per Western Blot erbracht werden konnte, ausgeschlossen werden, schienen aber auf Grund der höchstens milden Toxizität von PatA ebenfalls unwahrscheinlich zu sein. Eine partiell auftretende zu hohe Bakterienlast käme eventuell noch für die zerstörerischen Effekte in Frage. Dazu müssten weitere Versuche mit niedrigeren MOIs durchgeführt werden. Abschließend ist es trotz partieller Bestätigung einer Lokalisation des Flag-PatA-Proteins an der Zytoplasmamembran in mit *L. pneumophila*-Mutanten infizierten U937 Makrophagen nicht möglich, eine konkrete Aussage zur PatA-Lokalisation während der U937 Wirtszellinfektion unter den getesteten Bedingungen, auf Grund einer ungenügenden Verifizierbarkeit der Ergebnisse zu treffen.



#### 4.2.4 Versuche zur Identifikation putativer Interaktionspartner von PatA

Ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Funktion eines Proteins ist die Identifikation von Interaktionspartnern des zu untersuchenden Proteins, um darüber Informationen zu erhalten, in welche biologischen Pfade das Protein eingebunden sein könnte. Da bisher noch ungeklärt ist, welche Funktion PatA an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle zukommt und ob eukaryote Faktoren dafür entscheidend sind bzw. am Transport mitwirken, wurde ein Pull-Down Assay mit rekombinantem Polyhistidin-getaggten PatAS73A-Protein (katalytisch inaktive Proteinvariante) und verschiedenen Wirtszelllysaten durchgeführt. In den mit A549 Lungenepithelzelllysaten durchgeführten Versuchen konnten dabei drei zusätzliche, in den Kontrollen nicht präsente, Proteinbanden detektiert werden. Der Einsatz von U937 Makropagenzelllysaten erbrachte eine zusätzliche Bande. Da die massenspektrometrische Analyse ergab, dass es sich bei allen vier Proteinen um PatA handelt, ist anzunehmen, dass PatA während des Versuches degradiert wurde und die Spaltprodukte als zusätzliche Banden im SDS PAGE-Gel nach der Silberfärbung detektiert werden konnten. Mit weitaus geringeren „Protein Scores“ wurden zusätzlich ein unbekanntes humanes Protein, die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus *Homo sapiens* und humanes *beta*-Aktin identifiziert. Ein Problem der Pull-Down Versuche, wie sie hier durchgeführt wurden, ist, dass wahrscheinlich nur stabile Protein-Protein-Interaktionen detektiert werden können. Schwache oder transiente Interaktionen, die oftmals mit Transportprozessen und enzymatischen Mechanismen assoziiert sind, können sehr schwer detektiert werden, da der Komplex über die Zeit wieder dissoziiert. Eine Strategie, dem entgegenzuwirken, könnte ein kovalentes *in vivo*-Crosslinking der Proteine mit photoreaktiven Aminosäurederivaten in den lebenden Zellen sein (323). Alternativ kann auch Formaldehyd, ein Membran-löslicher *Crosslinker*, der in der Lage ist, Zellen zu penetrieren, verwendet werden.

Aufgrund der sehr geringen „Protein Scores“, mit denen die zusätzlichen humanen Proteine identifiziert wurden, sind diese allenfalls als Hinweise auf mögliche interagierende Proteine zu werten. Sehr interessant wäre jedoch eine putative Assoziation von PatA mit Aktin, da erst kürzlich für VipA, ein Effektor, der zusammen mit PatA (wurde in dieser Studie als VipD bezeichnet) in einer Studie zu Vesikeltransportstörungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurde, eine Bindung an Aktin beschrieben wurde (318). Dabei zeigte VipA ebenfalls eine charakteristische punktförmige Lokalisation in eukaryotischen Zellen und Hefen, die mit Aktin-reichen Regionen und dem multivesikulären Netzwerk assoziiert sind, aber nicht mit der *Legionella*-containing vacuole. Dabei wurde beschrieben, dass im Falle von

VipA keine zusätzlichen Effektoren für eine Bindung an die eukaryotischen Zielstrukturen notwendig waren (318). In der Sequenz von VipA wurden zwar eine zentrale *coiled-coil*-Region und C-terminale Prolin-reiche Regionen als typische Mediatoren für Interaktionen mit anderen Proteinen, jedoch keine typischen Aktin-bindenden Motive beschrieben, weshalb von einem neuen molekularen Mechanismus ausgegangen wurde (318). Dies könnte auch auf PatA zutreffen, da auch in diesem Protein keine typischen Motive oder Domänen im Hinblick auf Proteininteraktionen zu finden sind. Ebenso wie VipA könnte auch PatA zu einem neuen Typ von Aktin-Nukleatoren gehören, die zur intrazellulären Lebensweise von *L. pneumophila* durch Veränderungen in der Zytoskelett-Dynamik beitragen könnten, um Wirtszell-Pathways zu beeinflussen. Eine Polymerisation von Aktin und ein intaktes mikrotubuläres Zytoskelett wurden auch für einen Eintritt von *L. pneumophila* in HeLa-Zellen beschrieben (324). Da PatA ein Effektor ist, der sekretiert wird, wenn *L. pneumophila* am virulentesten ist, könnte eine mögliche Interaktion mit Aktin den vermehrten Eintritt von Bakterien in die Wirtszelle vorbereiten und so zum Prozess der bakteriellen Dissemination beitragen. Eine Interaktion des PatA-Proteins mit Aktin müsste jedoch zuerst experimentell gezeigt werden. Dies könnte ebenso durch Pull-Down Assays und Aktin Polymerisations-Assays (318) geschehen.

## Literaturverzeichnis

1. McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., and Dowdle, W. R. (1977) Legionnaires' disease, *New England Journal of Medicine* 297, 1197-1203.
2. Brenner, D. O. N. J., Steigerwalt, A. G., and McDade, J. E. (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova, *Annals of Internal Medicine* 90, 656-658.
3. Kaufmann, A. F., McDade, J. E., Patton, C. M., Bennett, J. V., Skaliy, P., Feeley, J. C., Anderson, D. C., Potter, M. E., Newhouse, V. F., and Gregg, M. B. (1981) Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission, *American Journal of Epidemiology* 114, 337-347.
4. Stout, J. E., and Yu, V. L. (1997) Legionellosis, *New England Journal of Medicine* 337, 682-687.
5. (2012) Epidemiologisches Bulletin 12/2012, *Robert Koch-Institut* 12.
6. Von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., Gonschior, S., Welte, T., and Lück, C. (2008) Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia, *Clinical Infectious Diseases* 46, 1356-1364.
7. (2009) Epidemiologisches Bulletin 47/2009, *Robert Koch-Institut* 47.
8. Fliermans, C., Cherry, W., Orrison, L., Smith, S., Tison, D., and Pope, D. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, *Applied and Environmental Microbiology* 41, 9-16.
9. Benson, R. F., and Fields, B. S. (1998) Classification of the genus *Legionella*., *Semin. Respir. Infect.* 13, 90-99.
10. Lück, P., and Steinert, M. (2006) Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Legionella*-Infektion., *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 49, 439-449.
11. Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R., and Hartland, E. L. (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*, *Clinical Microbiology Reviews* 23, 274-298.
12. Marston, B. J., Plouffe, J. F., File Jr, T. M., Hackman, B. A., Salstrom, S. J., Lipman, H. B., Kolczak, M. S., and Breiman, R. F. (1997) Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio, *Archives of Internal Medicine* 157, 1709.
13. Muder, R. R., and Victor, L. Y. (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Clinical Infectious Diseases* 35, 990-998.
14. Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M., and Paterson, D. L. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey, *Journal of Infectious Diseases* 186, 127-128.
15. Rowbotham, T. J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *Journal of Clinical Pathology* 33, 1179-1183.
16. Skaliy, P., and McEachern, H. V. (1979) Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water, *Annals of Internal Medicine* 90, 662-663

17. Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2047-2053.
18. Barker, J., Brown, M., Collier, P. J., Farrell, I., and Gilbert, P. (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation, *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2420-2425.
19. Cirillo, J. D., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion, *Infection and Immunity* 62, 3254-3261.
20. Cirillo, J. D., Cirillo, S. L. G., Yan, L., Bermudez, L. E., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 67, 4427-4434.
21. King, C. H., Shotts Jr, E. B., Wooley, R. E., and Porter, K. G. (1988) Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination, *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3023-3033.
22. Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W., and Ashburn, R. J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp., *Applied and Environmental Microbiology* 64, 279-286.
23. Katz, S., and Hammel, J. (1987) The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*., *Annals of Clinical & Laboratory Science* 17, 150.
24. (2007) Epidemiologisches Bulletin 50/2007, *Robert Koch-Institut* 50.
25. Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., and Donlan, R. M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system., *Microbiology* 147, 3121.
26. Rogers, J., Dowsett, A., Dennis, P., Lee, J., and Keevil, C. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora., *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1585-1592.
27. Schaefer, B., Brodhun, B., Wischnewski, N., and Chorus, I. (2011) Legionellen im Trinkwasserbereich, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 54, 671-679.
28. Benkel, D. H., McClure, E. M., Woolard, D., Rullan, J. V., Miller Jr, G. B., Jenkins, S. R., Hershey, J. H., Benson, R. F., Pruckler, J. M., and Brown, E. W. (2000) Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa, *International Journal of Epidemiology* 29, 1092-1098.
29. Mahoney, F. J., Hoge, C. W., Farley, T. A., Barbaree, J. M., Breiman, R. F., Benson, R. F., and McFarland, L. M. (1992) Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine, *Journal of Infectious Diseases* 165, 736-739.
30. Mouchtouri, V. A., Goutziana, G., Kremastinou, J., and Hadjichristodoulou, C. (2010) *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures, *American Journal of Infection Control* 38, 50-55.
31. Steinert, M., Ockert, G., Lück, C., and Hacker, J. (1998) Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system, *Zentralblatt für Bakteriologie* 288, 331-342.
32. Muder, R. R., Yu, V. L., and Woo, A. H. (1986) Mode of transmission of *Legionella pneumophila*: a critical review, *Archives of Internal Medicine* 146, 1607.

33. Fields, B. S., Benson, R. F., and Besser, R. E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical Microbiology Reviews* 15, 506-526.
34. Kirmeyer, G., Foust, G., G., P., Simmler, J., and LeChevallier, M. W. (1993) Optimizing Chloramines Treatment, *AWWA Research Foundation, Denver, Colorado*.
35. Steinert, M., and Heuner, K. (2005) *Dictyostelium* as host model for pathogenesis, *Cellular Microbiology* 7, 307-314.
36. Hammer, B. K., and Swanson, M. S. (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp, *Molecular Microbiology* 33, 721-731.
37. Bachman, M. A., and Swanson, M. S. (2004) The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 72, 3284-3293.
38. Hammer, B. K., Tateda, E. S., and Swanson, M. S. (2002) A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology* 44, 107-118.
39. Zusman, T., Gal-Mor, O., and Segal, G. (2002) Characterization of a *Legionella pneumophila* *relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression, *Journal of Bacteriology* 184, 67-75.
40. Rasis, M., and Segal, G. (2009) The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors, *Molecular Microbiology* 72, 995-1010.
41. Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology* 72, 741-762.
42. Byrne, B., and Swanson, M. S. (1998) Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions, *Infection and Immunity* 66, 3029-3034.
43. Horwitz, M. A. (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil, *Cell* 36, 27-33.
44. Kwaik, Y. A. (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum, *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2022-2028.
45. Bozue, J. A., and Johnson, W. (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion, *Infection and Immunity* 64, 668-673.
46. Rechnitzer, C., and Blom, J. (1989) Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes, *Apmis* 97, 105-114.
47. Dreyfus, L. A. (1987) Virulence associated ingestion of *Legionella pneumophila* by HeLa cells, *Microbial Pathogenesis* 3, 45-52.
48. Garduño, R. A., Garduño, E., and Hoffman, P. S. (1998) Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model, *Infection and Immunity* 66, 4602-4610.
49. McCusker, K., Braaten, B., Cho, M., and Low, D. (1991) *Legionella pneumophila* inhibits protein synthesis in Chinese hamster ovary cells, *Infection and Immunity* 59, 240-246.
50. Newton, H. J., Sansom, F. M., Dao, J., Cazalet, C., Brüggemann, H., Albert-Weissenberger, C., Buchrieser, C., Cianciotto, N. P., and Hartland, E. L. (2008) Significant role for *ladC* in initiation of *Legionella pneumophila* infection, *Infection and Immunity* 76, 3075-3085.

51. Cirillo, S. L. G., Bermudez, L. E., El-Etr, S. H., Duhamel, G. E., and Cirillo, J. D. (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence, *Infection and Immunity* 69, 508.
52. Cirillo, S. L. G., Lum, J., and Cirillo, J. D. (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*, *Microbiology* 146, 1345.
53. Newton, H. J., Sansom, F. M., Bennett-Wood, V., and Hartland, E. L. (2006) Identification of *Legionella pneumophila*-specific genes by genomic subtractive hybridization with *Legionella micdadei* and identification of *lpnE*, a gene required for efficient host cell entry, *Infection and Immunity* 74, 1683-1691.
54. Ridenour, D. A., Cirillo, S. L. G., Feng, S., Samrakandi, M. M., and Cirillo, J. D. (2003) Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion, *Infection and Immunity* 71, 6256-6263.
55. Chong, A., Lima, C. A., Allan, D. S., Nasrallah, G. K., and Garduño, R. A. (2009) The purified and recombinant *Legionella pneumophila* chaperonin alters mitochondrial trafficking and microfilament organization, *Infection and Immunity* 77, 4724-4739.
56. Hubber, A., and Roy, C. R. (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26, 261-283.
57. Horwitz, M. A. (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes, *The Journal of Experimental Medicine* 158, 1319.
58. Horwitz, M. A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes, *The Journal of Experimental Medicine* 158, 2108.
59. Horwitz, M. A., and Maxfield, F. R. (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes, *The Journal of Cell Biology* 99, 1936-1943.
60. Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., and Roy, C. R. (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane, *Journal of Cell Science* 114, 4637-4650.
61. Kagan, J. C., Stein, M. P., Pypaert, M., and Roy, C. R. (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle, *The Journal of Experimental Medicine* 199, 1201-1211.
62. Allan, B. B., Moyer, B. D., and Balch, W. E. (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion, *Science* 289, 444-448.
63. Moyer, B. D., Allan, B. B., and Balch, W. E. (2001) Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle cis-Golgi Tethering, *Traffic* 2, 268-276.
64. Wieland, H., Goetz, F., and Neumeister, B. (2004) Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes, *Journal of Infectious Diseases* 189, 1610-1614.
65. Kagan, J. C., and Roy, C. R. (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites, *Nature Cell Biology* 4, 945-954.
66. Sturgill-Koszycki, S., and Swanson, M. S. (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles, *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1261-1272.
67. Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M. A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., and Coppée, J. Y. (2006) Virulence strategies for

- infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*, *Cellular Microbiology* 8, 1228-1240.
68. Husmann, L. K., and Johnson, W. (1994) Cytotoxicity of extracellular *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 62, 2111-2114.
  69. Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L., and Isberg, R. R. (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology* 27, 323-336.
  70. Silveira, T. N., and Zamboni, D. S. (2010) Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis, *Infection and Immunity* 78, 1403-1413.
  71. Den Boer, J., and Yzerman, E. (2004) Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23, 871-878.
  72. Lück, P. C., Helbig, J., von Baum, H., and Marre, R. (2006) Diagnostics and clinical disease treatment: usefulness of microbiological diagnostic methods for detection of *Legionella* infections, *Legionella—State of the art—30 years after its recognition*, 15-24.
  73. Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C., and Lück, P. (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups, *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2841-2845.
  74. Ratcliff, R. M., Lanser, J. A., Manning, P. A., and Heuzenroeder, M. W. (1998) Sequence-Based Classification Scheme for the Genus *Legionella* Targeting the *mip* Gene, *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1560-1567.
  75. Höffken, G., P.-E.-G. f. Chemotherapie (2009) *S3-Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen (akute Bronchitis, akute Exazerbation einer chronischen Bronchitis, Influenza und andere respiratorische Virusinfektionen) sowie ambulant erworbener Pneumonie: Kurzfassung*, Thieme.
  76. Edelstein, P. H. (1998) Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change, *Annals of Internal Medicine* 129, 328-330.
  77. Roig, J., and Rello, J. (2003) Legionnaires' disease: a rational approach to therapy, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 1119-1129.
  78. Edelstein, P. H. (2002) Chemotherapy of Legionnaires' disease with macrolide or quinolone antimicrobial agents, *A Legionella*, Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, Cianciotto N, Fields BS, Frosh M, Hacker J, Lück PC eds. ASM Press Washington DC, 183-188.
  79. Plouffe, J. F., Breiman, R. F., Fields, B. S., Herbert, M., Inverso, J., Knirsch, C., Kolokathis, A., Marrie, T. J., Nicolle, L., and Schwartz, D. B. (2003) Azithromycin in the treatment of *Legionella* pneumonia requiring hospitalization, *Clinical Infectious Diseases* 37, 1475.
  80. Engleberg, N., Carter, C., Weber, D., Cianciotto, N., and Eisenstein, B. (1989) DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity, *Infection and Immunity* 57, 1263-1270.
  81. Cianciotto, N., Eisenstein, B., Mody, C., Toews, G., and Engleberg, N. (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection, *Infection and Immunity* 57, 1255-1262.
  82. Wagner, C., Khan, A. S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Ünal, C., Lorenz, U., Fischer, G., Hacker, J., and Steinert, M. (2007) Collagen binding protein Mip enables

- Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix, *Cellular Microbiology* 9, 450-462.
83. Backert, S., and Meyer, T. F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis, *Current Opinion in Microbiology* 9, 207-217.
  84. Luo, Z. Q. (2011) Targeting one of its own: expanding roles of substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm type IV secretion system, *Frontiers in Microbiology* 2.
  85. Jacobi, S., and Heuner, K. (2003) Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*, *International Journal of Medical Microbiology* 293, 349-358.
  86. De Buck, E., Maes, L., Meyen, E., Van Mellaert, L., Geukens, N., Anné, J., and Lammertyn, E. (2005) *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 *tatB* and *tatC* affect intracellular replication and biofilm formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 1413-1420.
  87. Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2005) The *Legionella pneumophila* *tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection, *Infection and Immunity* 73, 2020-2032.
  88. De Buck, E., Höper, D., Lammertyn, E., Hecker, M., and Anné, J. (2008) Differential 2-D protein gel electrophoresis analysis of *Legionella pneumophila* wild type and Tat secretion mutants, *International Journal of Medical Microbiology* 298, 449-461.
  89. De Buck, E., Lebeau, I., Maes, L., Geukens, N., Meyen, E., Van Mellaert, L., Anné, J., and Lammertyn, E. (2004) A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 654-661.
  90. Luo, Z. Q., and Isberg, R. R. (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 841.
  91. Heidtman, M., Chen, E. J., Moy, M. Y., and Isberg, R. R. (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways, *Cellular Microbiology* 11, 230-248.
  92. Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G., and Pupko, T. (2009) Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach, *PLoS Pathogens* 5, e1000508.
  93. Huang, L., Boyd, D., Amyot, W. M., Hempstead, A. D., Luo, Z. Q., O'Connor, T. J., Chen, C., Machner, M., Montminy, T., and Isberg, R. R. (2011) The E Block motif is associated with *Legionella pneumophila* translocated substrates, *Cellular Microbiology* 13, 227-245.
  94. Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., and Luo, Z. Q. (2011) Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*, *PLoS One* 6, e17638.
  95. Bandyopadhyay, P., Liu, S., Gabbai, C. B., Venitelli, Z., and Steinman, H. M. (2007) Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 75, 723-735.
  96. Lory, S., and Strom, M. S. (1997) Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa*-a review, *Gene* 192, 117-121.
  97. Ayers, M., Howell, P. L., and Burrows, L. L. (2010) Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries, *Future Microbiology* 5, 1203-1218.
  98. Liles, M. R., Viswanathan, V., and Cianciotto, N. P. (1998) Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion, *Infection and Immunity* 66, 1776-1782.



99. Cianciotto, N. P. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons, *Trends in Microbiology* 13, 581-588.
100. Evans, F. F., Egan, S., and Kjelleberg, S. (2008) Ecology of type II secretion in marine *gammaproteobacteria*, *Environmental Microbiology* 10, 1101-1107.
101. Cianciotto, N. P. (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*, *Future Microbiology* 4, 797-805.
102. McCoy-Simandle, K., Stewart, C. R., Dao, J., DebRoy, S., Rossier, O., Bryce, P. J., and Cianciotto, N. P. (2011) *Legionella pneumophila* type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia, *Infection and Immunity* 79, 1984-1997.
103. Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. J., and Sandkvist, M. (2006) Type II secretion: from structure to function, *FEMS Microbiology Letters* 255, 175-186.
104. Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1694, 163-179.
105. Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., and Saier Jr, M. H. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella, *Microbiology* 149, 3051-3072.
106. Lybarger, S. R., Johnson, T. L., Gray, M. D., Sikora, A. E., and Sandkvist, M. (2009) Docking and assembly of the type II secretion complex of *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology* 191, 3149-3161.
107. Arts, J., De Groot, A., Ball, G., Durand, E., El Khattabi, M., Filloux, A., Tommassen, J., and Koster, M. (2007) Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF), *Microbiology* 153, 1582-1592.
108. DebRoy, S., Aragon, V., Kurtz, S., and Cianciotto, N. P. (2006) *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants, *Infection and Immunity* 74, 5152-5160.
109. Pearce, M. M., and Cianciotto, N. P. (2009) *Legionella pneumophila* secretes an endoglucanase that belongs to the family-5 of glycosyl hydrolases and is dependent upon type II secretion, *FEMS Microbiology Letters* 300, 256-264.
110. Stewart, C. R., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion, *Journal of Bacteriology* 191, 1537-1546.
111. Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., and Cianciotto, N. P. (2000) Secreted Enzymatic Activities of Wild-Type and *pilD*-Deficient *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 68, 1855-1863.
112. Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N. P., and Flieger, A. (2005) Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 73, 2899.
113. Aragon, V., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2002) *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities, *Microbiology* 148, 2223-2231.
114. Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Stevanovic, S., Cianciotto, N. P., and Neumeister, B. (2001) Novel Lysophospholipase A Secreted by *Legionella pneumophila*, *Journal of Bacteriology* 183, 2121-2124.
115. Flieger, A., Neumeister, B., and Cianciotto, N. P. (2002) Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine, *Infection and Immunity* 70, 6094-6106.
116. Rossier, O., Dao, J., and Cianciotto, N. P. (2008) The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease

- that contributes to differential infection among protozoan hosts, *Applied and Environmental Microbiology* 74, 753-761.
117. Rossier, O., Dao, J., and Cianciotto, N. P. (2009) A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*, *Microbiology* 155, 882-890.
  118. Söderberg, M. A., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures, *Journal of Bacteriology* 186, 3712-3720.
  119. Brand, B. C., Sadosky, A. B., and Shuman, H. A. (1994) The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages, *Molecular Microbiology* 14, 797-808.
  120. Matthews, M., and Roy, C. R. (2000) Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells, *Infection and Immunity* 68, 3971-3982.
  121. Segal, G., Russo, J. J., and Shuman, H. A. (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology* 34, 799-809.
  122. Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., and Vandenesch, F. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity, *Nature Genetics* 36, 1165-1173.
  123. Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S. M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., and Feder, M. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*, *Science* 305, 1966-1968.
  124. Schroeder, G., Petty, N., Mousnier, A., Harding, C., Vogrin, A., Wee, B., Fry, N., Harrison, T., Newton, H., and Thomson, N. (2010) The genome of *Legionella pneumophila* strain 130b contains a unique combination of type IV secretion systems and encodes novel Dot/Icm secretion system effector proteins, *Journal of Bacteriology*.
  125. Isberg, R. R., O'Connor, T. J., and Heidtman, M. (2008) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells, *Nature Reviews Microbiology* 7, 13-24.
  126. Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K., and Isberg, R. R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*, *Science* 279, 873-876.
  127. Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H. A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 1669.
  128. Edelstein, P. H., Edelstein, M. A. C., Higa, F., and Falkow, S. (1999) Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 8190.
  129. Vincent, C. D., and Vogel, J. P. (2006) The *Legionella pneumophila* IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth, *Molecular Microbiology* 61, 596-613.
  130. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G., and Roy, C. R. (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling, *Nature* 450, 365-369.
  131. Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J., and Kwaik, Y. A. (2007) Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*, *Cellular Microbiology* 9, 246-264.

132. Losick, V. P., and Isberg, R. R. (2006) NF- $\kappa$ B translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*, *The Journal of Experimental Medicine* 203, 2177-2189.
133. Nogueira, C. V., Lindsten, T., Jamieson, A. M., Case, C. L., Shin, S., Thompson, C. B., and Roy, C. R. (2009) Rapid pathogen-induced apoptosis: a mechanism used by dendritic cells to limit intracellular replication of *Legionella pneumophila*, *PLoS Pathogens* 5, e1000478.
134. Laguna, R. K., Creasey, E. A., Li, Z., Valtz, N., and Isberg, R. R. (2006) A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18745-18750.
135. Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010) *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector, *PLoS Pathogens* 6, e1001216.
136. Liu, Y., Gao, P., Banga, S., and Luo, Z. Q. (2008) An in vivo gene deletion system for determining temporal requirement of bacterial virulence factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9385.
137. Ensminger, A. W., and Isberg, R. R. (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts, *Current Opinion in Microbiology* 12, 67-73.
138. Rowe, G. E., and Welch, R. A. (1994) Assays of hemolytic toxins, *Methods in Enzymology* 235, 657-667.
139. Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J., and Goebel, W. (1996) Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 178, 5422-5430.
140. Alli, O. A. T., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., and Kwaik, Y. A. (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 68, 6431-6440.
141. Molmeret, M., Alli, O. A. T., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N. P., and Kwaik, Y. A. (2002) *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells, *Infection and Immunity* 70, 69-78.
142. Baine, W. B., Rasheed, J. K., Mackel, D., Bopp, C., Wells, J., and Kaufmann, A. (1979) Exotoxin activity associated with the Legionnaires disease bacterium, *Journal of Clinical Microbiology* 9, 453-456.
143. Dreyfus, L. A., and Iglewski, B. (1986) Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 51, 736-743.
144. Quinn, F., and Tompkins, L. (1989) Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities, *Molecular Microbiology* 3, 797-805.
145. Quinn, F., Keen, M., and Tompkins, L. (1989) Genetic, immunological, and cytotoxic comparisons of *Legionella* proteolytic activities, *Infection and Immunity* 57, 2719-2725.
146. Rdest, U., Wintermeyer, E., Ludwig, B., and Hacker, J. (1991) Legiolysin, a new hemolysin from *L. pneumophila*, *Zentralblatt für Bakteriologie* 274, 471-474.
147. Lehninger, A. (1975) Biochemistry (2nd edn), *Worth, New York*, 189-195.
148. Liu, P. V. (1977) Exotoxins of gram-negative bacteria exclusive of enterotoxins, *Perspectives in Toxicology*, 43-60.
149. Finnerty, W., Makula, R., and Feeley, J. C. (1979) Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium, *Annals of Internal Medicine* 90, 631-634.

150. Banerji, S., Aurass, P., and Flieger, A. (2008) The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila*-identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence, *International Journal of Medical Microbiology* 298, 169-181.
151. Niewoehner, D. E., Rice, K., Sinha, A. A., and Wangenstein, D. (1987) Injurious effects of lysophosphatidylcholine on barrier properties of alveolar epithelium, *Journal of Applied Physiology* 63, 1979-1986.
152. Weltzien, H. U. (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta* 559, 259.
153. Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Mayer, H. A., Kehrer, U., Mußotter, J., Bartmann, P., and Neumeister, B. (2000) Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids, *FEMS Microbiology Letters* 188, 129-133.
154. Holm, B. A., Keicher, L., Liu, M., Sokolowski, J., and Enhorning, G. (1991) Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases, *Journal of Applied Physiology* 71, 317-321.
155. Dennis, E. A. (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes, *Trends in Biochemical Sciences* 22, 1-2.
156. Prokazova, N., Zvezdina, N., and Korotaeva, A. (1998) Review: effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction, *Biochem (Mosc)* 63, 31-37.
157. Vadas, P., Browning, J., Edelson, J., and Pruzanski, W. (1993) Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states, *Journal of Lipid Mediators* 8, 1.
158. Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Giannattasio, G., Marone, G., and Triggiani, M. (2003) Secretory Phospholipases A2 as Multivalent Mediators of Inflammatory and Allergic Disorders, *International Archives of Allergy and Immunology* 131, 153-163.
159. Schmiel, D. H., and Miller, V. L. (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis, *Microbes and Infection* 1, 1103-1112.
160. DebRoy, S., Dao, J., Söderberg, M., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2006) *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19146-19151.
161. Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M., and Heuner, K. (2004) Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity, *Infection and Immunity* 72, 2648-2658.
162. Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., Schunder, E., Heuner, K., and Flieger, A. (2009) Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* Represents a Novel Lipase Family *Journal of Biological Chemistry* 284, 27185-27194.
163. Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P., and Pier, G. B. (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread, *Infection and Immunity* 68, 3998-4004.
164. La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M., and Heitz, T. (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*, *The Plant Journal* 44, 810-825.
165. Kurat, C. F., Natter, K., Petschnigg, J., Wolinski, H., Scheuringer, K., Scholz, H., Zimmermann, R., Leber, R., Zechner, R., and Kohlwein, S. D. (2006) Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast, *Journal of Biological Chemistry* 281, 491-500.

166. Shohdy, N., Efe, J. A., Emr, S. D., and Shuman, H. A. (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4866.
167. Banerji, S., and Flieger, A. (2004) Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria?, *Microbiology* 150, 522-525.
168. Wilson, P. A., Gardner, S. D., Lambie, N. M., Commans, S. A., and Crowther, D. J. (2006) Characterization of the human patatin-like phospholipase family, *Journal of Lipid Research* 47, 1940-1949.
169. Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W. C., Brown, S. M., Pershing, J. C., Purcell, J. P., and Alibhai, M. F. (2003) The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad, *Biochemistry* 42, 6696-6708.
170. Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Quader, H., and Scherer, G. F. E. (2002) Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction, *Plant Physiology* 130, 90-101.
171. Strickland, J. A., Orr, G. L., and Walsh, T. A. (1995) Inhibition of *Diabrotica* larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers, *Plant Physiology* 109, 667-674.
172. Camera, S. L., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D., and Heitz, T. (2009) The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 469-481.
173. Kato, S., Yoshimura, T., Hemmi, H., and Moriyama, R. (2010) Biochemical Analysis of a Novel Lipolytic Enzyme YvdO from *Bacillus subtilis* 168, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 701-706.
174. Rahman, M. S., Ammerman, N. C., Sears, K. T., Ceraul, S. M., and Azad, A. F. (2010) Functional characterization of a phospholipase A2 homolog from *Rickettsia typhi*, *Journal of Bacteriology* 192, 3294-3303.
175. Salacha, R., Kovačić, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bleves, S. (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system, *Environmental Microbiology* 12, 1498-1512.
176. Aurass, P., Pless, B., Rydzewski, K., Holland, G., Bannert, N., and Flieger, A. (2009) *bdhA-patD* operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of *Legionella pneumophila* mutants defective for amoeba infection, *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4506-4515.
177. VanRheenen, S. M., Luo, Z. Q., O'Connor, T., and Isberg, R. R. (2006) Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells, *Infection and Immunity* 74, 3597-3606.
178. Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A., and Ghosh, P. (2003) In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors, *Journal of Biological Chemistry* 278, 41326.
179. Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., and Long, R. M. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU, *The EMBO Journal* 22, 2959-2969.
180. Hirschberg, H. J. H. B., Simons, J. W. F. A., Dekker, N., and Egmond, M. R. (2001) Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A, *European Journal of Biochemistry* 268, 5037-5044.

181. Aneja, P., and Charles, T. C. (2005) Characterization of *bdhA*, encoding the enzyme D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, from *Sinorhizobium* sp. strain NGR234, *FEMS Microbiology Letters* 242, 87-94.
182. Salyers, A. A., and Whitt, D. D. (2002) *Bacterial Pathogenesis: A molecular approach*, 2nd edn. Washington, DC: ASM Press.
183. Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis, *Med Mal Infect* 36, 78-91.
184. Barker, A. P., Vasil, A. I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P. J., and Vasil, M. L. (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis, *Molecular Microbiology* 53, 1089-1098.
185. König, B., Vasil, M., and König, W. (1997) Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes, *Journal of Medical Microbiology* 46, 471-478.
186. Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity, *Infection and Immunity* 67, 2371-2376.
187. Frank, D. W. (1997) The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Microbiology* 26, 621-629.
188. Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M. J., Wu, C., Mende-Mueller, L., and Frank, D. W. (1997) ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury, *Molecular Microbiology* 25, 547-557.
189. Hauser, A. R., and Engel, J. N. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells, *Infection and Immunity* 67, 5530-5537.
190. Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P., and Sawa, T. (2004) Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316, 323-331.
191. Sato, H., Feix, J. B., and Frank, D. W. (2006) Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU, *Biochemistry* 45, 10368-10375.
192. Saliba, A., Nascimento, D., Silva, M., Assis, M., Gayer, C., Raymond, B., Coelho, M., Marques, E., Touqui, L., and Albano, R. (2005) Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, *Cellular Microbiology* 7, 1811-1822.
193. Cuzick, A., Stirling, F. R., Lindsay, S. L., and Evans, T. J. (2006) The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production, *Infection and Immunity* 74, 4104-4113.
194. Rabin, S. D. P., and Hauser, A. R. (2005) Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU, *Infection and Immunity* 73, 573.
195. Rabin, S. D. P., Veessenmeyer, J. L., Bieging, K. T., and Hauser, A. R. (2006) A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells, *Infection and Immunity* 74, 2552.
196. Aurass, P. (2008) Charakterisierung Patatin-ähnlicher Proteine des Lungenpathogens *Legionella pneumophila*, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin*.
197. Wlatter, L. A., Sadosky, A. B., and Shuman, H. A. (1994) Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Tn903 *dlllacZ*: identification of a growth-phase regulated pigmentation gene, *Molecular Microbiology* 11, 641-653.

198. Jepras, R., Fitzgeorge, R., and Baskerville, A. (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs, *The Journal of Hygiene* 95, 29.
199. Sadosky, A. B., Wiater, L. A., and Shuman, H. A. (1993) Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages, *Infection and Immunity* 61, 5361.
200. Edelstein, P. H. (1981) Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens, *Journal of Clinical Microbiology* 14, 298.
201. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463.
202. Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., and Sebo, P. (2010) *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its  $\beta 2$  Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps, *PLoS Pathogens* 6, e1000901.
203. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
204. Plekhanov, A. Y. (1999) Rapid staining of lipids on thin-layer chromatograms with amido black 10B and other water-soluble stains, *Analytical Biochemistry* 271, 186-186.
205. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
206. Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8, 93-99.
207. Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Cottrell, J., and London, U. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
208. Chrisope, G., Fox, C., and Marshall, R. (1976) Lecithin agar for detection of microbial phospholipases, *Applied and Environmental Microbiology* 31, 784.
209. McMurray, W., and Magee, W. (1972) Phospholipid metabolism, *Annual Review of Biochemistry* 41, 129-160.
210. Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. (1988) Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction, *Genetics* 120, 621.
211. Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. W. (2002) Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH 2. Auflage.
212. Samrakandi, M. M., Cirillo, S. L. G., Ridenour, D. A., Bermudez, L. E., and Cirillo, J. D. (2002) Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains, *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1352.
213. Pan, X., Lührmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M. A., and Roy, C. R. (2008) Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors, *Science* 320, 1651.
214. Upton, A. M., and McKinney, J. D. (2007) Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*, *Microbiology* 153, 3973.
215. Horswill, A. R., and Escalante-Semerena, J. C. (1999) *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle, *Journal of Bacteriology* 181, 5615.
216. Textor, S., Wendisch, V. F., Graaf, A. A. D., Müller, U., Linder, M. I., Linder, D., and Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria, *Archives of Microbiology* 168, 428-436.

217. Bentley, R., and Haslam, E. (1990) The Shikimate Pathway-A Metabolic Tree with Many Branches, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25, 307-384.
218. Wiater, L. A., Sadosky, A. B., and Shuman, H. A. (1994) Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Jn903 dIIIacZ: identification of a growth-phase-regulated pigmentation gene, *Molecular Microbiology* 11, 641-653.
219. Wintermeyer, E., Rdest, U., Ludwig, B., Debes, A., and Hacker, J. (1991) Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology* 5, 1135-1143.
220. Nichols, B. P., Seibold, A. M., and Doktor, S. Z. (1989) *para*-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps, *Journal of Biological Chemistry* 264, 8597.
221. Tran, P. V., Bannor, T. A., Doktor, S., and Nichols, B. P. (1990) Chromosomal organization and expression of *Escherichia coli* *pabA*, *Journal of Bacteriology* 172, 397-410.
222. Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., and Gwadz, M. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database, *Nucleic Acids Research* 37, D205-D210.
223. Sato, H., Feix, J. B., Hillard, C. J., and Frank, D. W. (2005) Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU, *Journal of Bacteriology* 187, 1192-1195.
224. Sato, H., and Frank, D. W. (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase, *Molecular Microbiology* 53, 1279-1290.
225. Schulert, G. S., Feltman, H., Rabin, S. D. P., Martin, C. G., Battle, S. E., Rello, J., and Hauser, A. R. (2003) Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia, *Journal of Infectious Diseases* 188, 1695.
226. Shaver, C. M., and Hauser, A. R. (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung, *Infection and Immunity* 72, 6969.
227. McCabe, J. B., and Berthiaume, L. G. (2001) N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae, *Molecular Biology of the Cell* 12, 3601-3617.
228. Planey, S. L., and Zacharias, D. A. (2009) Palmitoyl acyltransferases, their substrates, and novel assays to connect them (Review), *Molecular Membrane Biology* 26, 14-31.
229. Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Hewlett, E. L. (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*, *Science* 266, 433.
230. Stanley, P., Packman, L. C., Koronakis, V., and Hughes, C. (1994) Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin, *Science* 266, 1992.
231. Stanley, P., Koronakis, V., and Hughes, C. (1998) Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 309.
232. Wootton, J. C. (1994) Sequences with 'unusual' amino acid compositions, *Current Opinion in Structural Biology* 4, 413-421.
233. Sim, K. L., and Creamer, T. P. (2004) Protein simple sequence conservation, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 54, 629-638.



234. Ulbert, S., Platani, M., Boue, S., and Mattaj, I. W. (2006) Direct membrane protein–DNA interactions required early in nuclear envelope assembly, *The Journal of Cell Biology* 173, 469.
235. Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I. J., Knapp, W., and Stockinger, H. (1991) GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases, *Science* 254, 1016.
236. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387, 569-572.
237. Brown, D. A. (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals, *Physiology* 21, 430-439.
238. Jacobson, K., Mouritsen, O. G., and Anderson, R. G. W. (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nature Cell Biology* 9, 7-14.
239. Helms, J. B., and Zurzolo, C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking, *Traffic* 5, 247-254.
240. Lafont, F., and Van Der Goot, F. G. (2005) Bacterial invasion via lipid rafts, *Cellular Microbiology* 7, 613-620.
241. Mañes, S., del Real, G., and Martinez-A, C. (2003) Pathogens: raft hijackers, *Nature Reviews Immunology* 3, 557-568.
242. Fivaz, M., Abrami, L., and van Der Goot, F. G. (1999) Landing on lipid rafts, *Trends in Cell Biology* 9, 212-213.
243. Rogers, S. Cell Biology Applications of Fluorescence Microscopy, [http://www.ihcworld.com/\\_protocols/immunofluorescence/](http://www.ihcworld.com/_protocols/immunofluorescence/).
244. Brown, D., Lydon, J., McLaughlin, M., Stuart-Tilley, A., Tyszkowski, R., and Alper, S. (1996) Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS), *Histochemistry and Cell Biology* 105, 261-267.
245. Alberts, B. (1998) The cell as a collection overview of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists, *Cell* 92, 291-294.
246. Percudani, R., and Peracchi, A. (2003) A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes, *EMBO Reports* 4, 850-854.
247. Molofsky, A. B., and Swanson, M. S. (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication, *Molecular Microbiology* 50, 445-461.
248. D'Auria, G., Jiménez-Hernández, N., Peris-Bondia, F., Moya, A., and Latorre, A. (2010) *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors, *BMC Genomics* 11, 181.
249. Shirron, N., Korem, M., Shuster, A., Leikin-Frenkel, A., and Rosenberg, M. (2008) Effect of alcohol on bacterial hemolysis, *Current Microbiology* 57, 318-325.
250. Parsot, C., and Mekalanos, J. J. (1991) Expression of the *Vibrio cholerae* gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of ToxR, the cholera toxin transcriptional activator, *Journal of Bacteriology* 173, 2842.
251. D'Auria, G., Jiménez, N., Peris-Bondia, F., Pelaz, C., Latorre, A., and Moya, A. (2008) Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein, *BMC Genomics* 9, 14.
252. Cirillo, S. L. G., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M. M., and Cirillo, J. D. (2002) Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae, *Microbiology* 148, 1667.
253. Economou, A., Hamilton, W., Johnston, A., and Downie, J. (1990) The *Rhizobium* nodulation gene nodO encodes a Ca<sup>2+</sup> (+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins, *The EMBO Journal* 9, 349.
254. Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Chavakis, T., and Bhakdi, S. (2005) Binding of *Escherichia coli* hemolysin and

- activation of the target cells is not receptor-dependent, *Journal of Biological Chemistry* 280, 36657.
255. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A., and Jakob, U. (2005) Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33, *Molecular Cell* 17, 381-392.
256. Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P. C. F., Lilie, H., and Jakob, U. (2007) The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor, *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 556-563.
257. Kang, H. J., Heo, D. H., Choi, S. W., Kim, K. N., Shim, J., Kim, C. W., Sung, H. C., and Yun, C. W. (2007) Functional characterization of Hsp33 protein from *Bacillus psychrosaccharolyticus*; additional function of HSP33 on resistance to solvent stress, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 743-750.
258. Kregel, K. C. (2002) Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *Journal of Applied Physiology* 92, 2177-2186.
259. Jules, M., and Buchrieser, C. (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics, *FEBS Letters* 581, 2829-2838.
260. Buchmeier, N. A., and Heffron, F. (1990) Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages, *Science* 248, 730-732.
261. Hoffman, P., and Garduno, R. (1999) Surface-Associated Heat Shock Proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: Roles in Pathogenesis and Immunity, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 7, 58-63.
262. VanBogelen, R., Kelley, P. M., and Neidhardt, F. (1987) Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 169, 26-32.
263. Dosselaere, F., and Vanderleyden, J. (2001) A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms, *Critical Reviews in Microbiology* 27, 75-131.
264. Kraemer, P. S., Mitchell, A., Pelletier, M. R., Gallagher, L. A., Wasnick, M., Rohmer, L., Brittnacher, M. J., Manoel, C., Skerrett, S. J., and Salama, N. R. (2009) Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice, *Infection and Immunity* 77, 232-244.
265. Meibom, K. L., and Charbit, A. (2010) *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence, *Frontiers in Microbiology* 1.
266. Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., and Forsman, M. (2003) Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 600-606.
267. El-Etr, S. H., Margolis, J. J., Monack, D., Robison, R. A., Cohen, M., Moore, E., and Rasley, A. (2009) *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection, *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7488-7500.
268. Charity, J. C., Blalock, L. A. T., Costante-Hamm, M. M., Kasper, D. L., and Dove, S. L. (2009) Small molecule control of virulence gene expression in *Francisella tularensis*, *PLoS Pathogens* 5, e1000641.
269. Asare, R., Akimana, C., Jones, S., and Abu Kwaik, Y. (2010) Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors, *Environmental Microbiology* 12, 2587-2612.
270. Chatfield, S., Roberts, M., Li, J., Starns, A., and Dougan, G. (1994) The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination, *Developments in Biological Standardization* 82, 35.

271. Chatfield, S., Roberts, M., Dougan, G., Hormaeche, C., and Khan, C. (1995) The development of oral vaccines against parasitic diseases utilizing live attenuated *Salmonella*, *Parasitology* 110, S17-S24.
272. Hoiseth, S. K., and Stocker, B. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines, *Nature* 291, 238-239.
273. Claiborne Fuqua, W., Coyne, V. E., Stein, D. C., Lin, C. M., and Weiner, R. M. (1991) Characterization of *melA*: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*, *Gene* 109, 131-136.
274. Rüetschi, U., Odelhög, B., Lindstedt, S., Barros-Söderling, J., Persson, B., and Jörnvall, H. (1992) Characterization of 4-hydroxy-phenylpyruvate dioxygenase. Primary structure of the *Pseudomonas* enzyme, *Eur. J. Biochem.* 205, 459-466.
275. Hacker, J., and Fischer, G. (1993) Immunophilins: structure—function relationship and possible role in microbial pathogenicity, *Molecular Microbiology* 10, 445-456.
276. Vickers, R., and Yu, V. (1984) Clinical laboratory differentiation of *Legionellaceae* family members with pigment production and fluorescence on media supplemented with aromatic substrates, *Journal of Clinical Microbiology* 19, 583-587.
277. Wintermeyer, E., Flügel, M., Ott, M., Steinert, M., Rdest, U., Mann, K., and Hacker, J. (1994) Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity* 62, 1109-1117.
278. Shinohara, R., Kanda, A., Ohnishi, K., Kiba, A., and Hikichi, Y. (2005) Contribution of folate biosynthesis to *Ralstonia solanacearum* proliferation in intercellular spaces, *Applied and Environmental Microbiology* 71, 417-422.
279. Cuccui, J., Easton, A., Chu, K., Bancroft, G., Oyston, P., Titball, R., and Wren, B. (2007) Development of signature-tagged mutagenesis in *Burkholderia pseudomallei* to identify genes important in survival and pathogenesis, *Infection and Immunity* 75, 1186-1195.
280. Smith, D. A., Parish, T., Stoker, N. G., and Bancroft, G. J. (2001) Characterization of Auxotrophic Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and Their Potential as Vaccine Candidates, *Infection and Immunity* 69, 1142-1150.
281. Crawford, R. M., Van De Verg, L., Yuan, L., Hadfield, T. L., Warren, R. L., Drazek, E. S., Houg, H., Hammack, C., Sasala, K., and Polsinelli, T. (1996) Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice, *Infection and Immunity* 64, 2188-2192.
282. Priebe, G. P., Meluleni, G. J., Coleman, F. T., Goldberg, J. B., and Pier, G. B. (2003) Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice after nasal immunization with a live, attenuated *aroA* deletion mutant, *Infection and Immunity* 71, 1453-1461.
283. Pilatz, S., Breitbach, K., Hein, N., Fehlhaber, B., Schulze, J., Brenneke, B., Eberl, L., and Steinmetz, I. (2006) Identification of *Burkholderia pseudomallei* genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence, *Infection and Immunity* 74, 3576-3586.
284. George, J., Pine, L., Reeves, M., and Harrell, W. K. (1980) Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*, *Journal of Clinical Microbiology* 11, 286-291.
285. Ristroph, J. D., Hedlund, K. W., and Gowda, S. (1981) Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth, *Journal of Clinical Microbiology* 13, 115-119.
286. Tesh, M. J., and Miller, R. D. (1981) Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth, *Journal of Clinical Microbiology* 13, 865-869.
287. Pine, L., George, J., Reeves, M., and Harrell, W. (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*, *Journal of Clinical Microbiology* 9, 615-626.

288. Sauer, J. D., Bachman, M. A., and Swanson, M. S. (2005) The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9924.
289. Faucher, S. P., Mueller, C. A., and Shuman, H. A. (2011) *Legionella pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages, *Frontiers in Microbiology* 2.
290. Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J. C. D. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*, *Molecular Microbiology* 47, 103-118.
291. Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C. D., and Yu, J. (2005) Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen, *Infection and Immunity* 73, 88-102.
292. Faucher, S. P., Porwollik, S., Dozois, C. M., McClelland, M., and Daigle, F. (2006) Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1906-1911.
293. Bergman, N. H., Anderson, E. C., Swenson, E. E., Janes, B. K., Fisher, N., Niemeyer, M. M., Miyoshi, A. D., and Hanna, P. C. (2007) Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* during infection of host macrophages, *Infection and Immunity* 75, 3434-3444.
294. Fukuto, H. S., Svetlanov, A., Palmer, L. E., Karzai, A. W., and Bliska, J. B. (2010) Global gene expression profiling of *Yersinia pestis* replicating inside macrophages reveals the roles of a putative stress-induced operon in regulating type III secretion and intracellular cell division, *Infection and Immunity* 78, 3700-3715.
295. Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M., and Eichinger, L. (2006) *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*, *Cellular Microbiology* 8, 438-456.
296. Schlame, M., Brody, S., and Hostetler, K. Y. (1993) Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes, *European Journal of Biochemistry* 212, 727-733.
297. Hauff, K. D., Choi, S. Y., Frohman, M. A., and Hatch, G. M. (2009) Cardiolipin synthesis is required to support human cholesterol biosynthesis from palmitate upon serum removal in Hela cells, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87, 813-820.
298. Mileykovskaya, E., Ryan, A. C., Mo, X., Lin, C. C., Khalaf, K. I., Dowhan, W., and Garrett, T. A. (2009) Phosphatidic acid and N-acylphosphatidylethanolamine form membrane domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol, *Journal of Biological Chemistry* 284, 2990-3000.
299. Chang, S. C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., Voelker, D. R., and Dowhan, W. (1998) Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry* 273, 14933-14941.
300. Wright, L. P., and Philips, M. R. (2006) Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications CAAX modification and membrane targeting of Ras, *Journal of Lipid Research* 47, 883-891.
301. Casey, P. J. (1995) Protein lipidation in cell signaling, *Science* 268, 221-225.
302. Al-Quadan, T., Price, C. T., London, N., Schueler-Furman, O., and AbuKwaik, Y. (2011) Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm, *Trends in Microbiology*.

303. Price, C. T. D., Al-Quadan, T., Santic, M., Jones, S. C., and Kwaik, Y. A. (2010) Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*, *The Journal of Experimental Medicine* 207, 1713-1726.
304. Reinicke, A. T., Hutchinson, J. L., Magee, A. I., Mastroeni, P., Trowsdale, J., and Kelly, A. P. (2005) A *Salmonella typhimurium* effector protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery, *Journal of Biological Chemistry* 280, 14620-14627.
305. Price, C. T. D., Jones, S. C., Amundson, K. E., and Kwaik, Y. A. (2010) Host-mediated post-translational prenylation of novel Dot/Icm-translocated effectors of *Legionella pneumophila*, *Frontiers in Microbiology* 1.
306. Ivanov, S. S., Charron, G., Hang, H. C., and Roy, C. R. (2010) Lipidation by the host prenyltransferase machinery facilitates membrane localization of *Legionella pneumophila* effector proteins, *Journal of Biological Chemistry* 285, 34686-34698.
307. Boucrot, E., Beuzón, C. R., Holden, D. W., Gorvel, J. P., and Méresse, S. (2003) *Salmonella typhimurium* SifA effector protein requires its membrane-anchoring C-terminal hexapeptide for its biological function, *Journal of Biological Chemistry* 278, 14196-14202.
308. Shen, Z., Wu, S. K., and Cho, W. (1994) Effects of specific fatty acid acylation of phospholipase A2 on its interfacial binding and catalysis, *Biochemistry* 33, 11598-11607.
309. Joseph, M., and Nagaraj, R. (1995) Interaction of peptides corresponding to fatty acylation sites in proteins with model membranes, *Journal of Biological Chemistry* 270, 16749-16755.
310. Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M., and Falkow, S. (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival, *Molecular Microbiology* 30, 175-188.
311. Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., and Groisman, E. A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 7800.
312. Hicks, S. W., Charron, G., Hang, H. C., and Galán, J. E. (2011) Subcellular Targeting of *Salmonella* Virulence Proteins by Host-Mediated S-Palmitoylation, *Cell Host & Microbe* 10, 9-20.
313. Killian, J. A. (2003) Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins, *FEBS Letters* 555, 134-138.
314. Huber, O., Kemler, R., and Langosch, D. (1999) Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin, *Journal of Cell Science* 112, 4415-4423.
315. De Felipe, K. S., Glover, R. T., Charpentier, X., Anderson, O. R., Reyes, M., Pericone, C. D., and Shuman, H. A. (2008) *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking, *PLoS Pathogens* 4, e1000117.
316. Coletta, A., Pinney, J. W., Solís, D. Y. W., Marsh, J., Pettifer, S. R., and Attwood, T. K. (2010) Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles, *BMC Systems Biology* 4, 43.
317. Stirling, F. R., Cuzick, A., Kelly, S. M., Oxley, D., and Evans, T. J. (2006) Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin, *Cellular Microbiology* 8, 1294-1309.
318. Franco, I. S., Shohdy, N., and Shuman, H. A. (2012) The *Legionella pneumophila* Effector VipA Is an Actin Nucleator That Alters Host Cell Organelle Trafficking, *PLoS Pathogens* 8, e1002546.

319. Veessenmeyer, J. L., Howell, H., Halavaty, A. S., Ahrens, S., Anderson, W. F., and Hauser, A. R. (2010) Role of the membrane localization domain of the *Pseudomonas aeruginosa* effector protein ExoU in cytotoxicity, *Infection and Immunity* 78, 3346-3357.
320. Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouilliot, S., Elsen, S., Lemaire, D., Skoufias, D. A., Huber, P., Attree, I., and Dessen, A. (2012) Structural Basis of Cytotoxicity Mediated by the Type III Secretion Toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS Pathogens* 8, e1002637.
321. Scheffold, A., Assenmacher, M., Reiners-Schramm, L., Lauster, R., and Radbruch, A. (2000) High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells, *Nature Medicine* 6, 107-110.
322. Zola, H. (1998) High-sensitivity immunofluorescence/flow cytometry: detection of cytokine receptors and other low-abundance membrane molecules, *Current Protocols in Cytometry* 6, 1-6.3.
323. Suchanek, M., Radzikowska, A., and Thiele, C. (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells, *Nature Methods* 2, 261-268.
324. Garduño, R. A., Quinn, F. D., and Hoffman, P. S. (1998) HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*, *Canadian Journal of Microbiology* 44, 430-440.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Antje Flieger für die umsichtige Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Vorschläge und Hinweise sowie fachlichen Anregungen und auch für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert danke ich sehr für die unkomplizierte Übernahme des zweiten Gutachtens. Herrn Prof. Andre Fleißner gebührt mein Dank für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dass mir die Zeit der Promotion am RKI in sehr guter Erinnerung bleiben wird, daran haben vor allem meine Kollegen und Kolleginnen Dr. Christina Lang, Dr. Philipp Auraß, dem ich besonders für die zahlreichen Hinweise und die Betreuung bezüglich der „PatA-Thematik“ danke, Dr. Sven Halbedel, Dr. Jennifer Bender, Katja Kuhle, Maren Schlegel, Katrin Jaschinski, Thomas Gerlach, Karan Gautam Kaval, Thorsten Wille, Ingolf Karl, Simone Dumschat und Susanne Karste einen großen Anteil. Ich danke euch sehr für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft und vor allem für die lustigen Grill-, DVD- und Kochabende.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des RKI, die mir im Rahmen der Promotion geholfen haben oder ein aufmunterndes Wort hatten sowie den anderen Doktoranden für die gute Stimmung auf unserem „Doktorandenflur“.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Freunden, einfach weil sie meine Freunde sind. Vor allem Fränze, Richard und Johann, die mir zu jeder Zeit einen Schlafplatz boten und große Anteilnahme zeigten und Susi, die einen erfrischenden Blick auf die Molekularbiologie warf, haben mir sehr geholfen. Auch Philipp möchte ich für einen Teil des Weges, den er mit mir gegangen ist, danken. Familie Palm gebührt in besonderer Weise mein Dank für die stete Hilfsbereitschaft und Anteilnahme in so vielen Dingen und dafür, dass ich auf ihrem Hof stets willkommen war.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern Regina und Gunter Seipel, danke ich, weil sie mich immer unterstützt haben, mir in allen Lebenssituationen zur Seite standen und dies auch immer tun werden.